

"Phycocyanin exprimierende Eukaryontenzelle"

Die Erfindung betrifft rekombinant hergestelltes Phycocyanin bzw. funktionell aktive Teile davon und nimmt die Priorität der europäischen Patentanmeldung 04 001 504.2 in Anspruch, auf die inhaltlich Bezug genommen wird..

5 In allen Bereichen der modernen Biologie - z.B. bei der DNA-Replikation, Transkription, Translation oder Kontrolle des Zellzyklus sowie Signaltransduktionen spielt die Wechselwirkung zwischen Proteinen eine essentielle Rolle. Konsequenterweise ist die Aufklärung dieser Abläufe nicht mehr nur allein die Domäne von Biochemikern. Vielmehr müssen sich nun auch Genetiker sowie Molekularbiologen oder Biophysiker mit der Aufklärung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beschäftigen.

10

Die Interaktionen zwischen Proteinen werden klassischerweise mit Hilfe biochemischer Methoden wie der Affinitätschromatographie oder der Immunpräzipitation 15 identifiziert oder quantifiziert. Häufig werden diese Methoden mit genetischen bzw. molekularbiologischen Verfahren kombiniert. Wird beispielsweise ein gesuchtes Protein von einer Bakteriophagen/cDNA Bibliothek exprimiert, kann die Interaktion in manchen Fällen mit einer spezifischen Protein-Sonde direkt im Lysat eines positiven Plaques nachgewiesen werden.

20 Eine Vielzahl der Verfahren zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht jedoch auf der Detektion dieser Wechselwirkungen *in vitro*. So ist zum einen die Übertragbarkeit der damit erzeugten Ergebnisse auf *in vivo* Bedingungen fraglich. Des weiteren können nur Wechselwirkungen detektiert werden 25 von Bindungspartnern, deren Dissoziationskonstanten nicht allzu groß sind. Andernfalls würden die zu detektierenden Wechselwirkungen den in der Regel stringenten und zeitaufwendigen Waschprotokollen nicht standhalten. Diese sind aber üblicherweise notwendig, um die störenden Hintergrundsignale auf ein akzeptabiles Maß senken zu können. Die Entwicklung von Systemen zur Untersuchung der 30 Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* stellt daher eine besondere Herausfor-

derung dar.

In der jüngeren Vergangenheit verwenden viele Wissenschaftler zur Untersuchung der Zellbiologie das sogenannte grüne Fluoreszenzprotein (GFP) aus *Aequorea victoria*. Bei GFP handelt es sich um ein fluoreszierendes Protein, dessen Klonierung und Expression in der Zwischenzeit in einer Vielzahl von Zellen und Organismen – z. B. in Bakterien, Pflanzen- und Tierzellen – gelungen ist. Damit kann das GFP in der Zellbiologie beispielsweise für die Lokalisation von Proteinen, für den Nachweis einer erfolgreichen Transfektion oder als Reporteren für eine Genexpression dienen.

Das GFP zeigt ein Absorptionsspektrum mit zwei Peaks, nämlich einen ersten Peak bei 395 nm und einen zweiten bei 470 nm. Dafür ist das Tyr<sup>66</sup> verantwortlich, das in seiner Hydroxy-Form durch die Anregung bei 395 nm in die Phenolat-Form übergeht. Diese emittiert nach entsprechender Anregung Licht einer Wellenlänge von 509 nm.

Damit liegt das Emissions- und Absorptionsspektrum des GFP genau in den spektralen Bereichen, in denen eine Vielzahl biologischer Substanzen eine Fluoreszenz aufweisen. Diese natürliche Fluoreszenz biologischer Systeme – auch als Autofluoreszenz bekannt – geht zu nicht unerheblichen Teilen auf Flavinderivate oder auf NADH- sowie NADPH-Derivate zurück. So werden Flavine beispielsweise durch Licht von 380-490 nm angeregt und emittieren Licht einer Wellenlänge von 520-560 nm. NADH sowie NADPH zeigen Absorptionsmaxima bei 360-390 nm, während sie die höchste Emission bei 440-470 nm aufweisen.

Diese Autofluoreszenz überschneidet sich daher mit dem für das GFP Protein typischen Spektrum, und ist bei der Verwendung von GFP in *in vivo* Studien für ein hohes Hintergrundrauschen verantwortlich. Dieses Hintergrundrauschen führt nicht selten zu einem Verlust an Klarheit und Aussagekraft der Versuchsergebnisse.

In der Vergangenheit wurden Verfahren entwickelt, um die Autofluoreszenz von der GFP Fluoreszenz zu unterscheiden. Diese Verfahren beruhen beispielsweise auf der Optimierung der für die Fluoreszenzdetektion verwendeten optischen Filter oder auf der sequentiellen Anregung der Probe zunächst mit einer auf die Anregung des GFP optimierten Wellenlänge und im Anschluß daran mit einer auf die Autofluoreszenz optimierten Wellenlänge. Die Differenz zwischen den erhaltenen

Meßsignalen gilt als Fluoreszenz des GFP allein. Diese letzte Methode ist als "Dual Wavelength Correction" bekannt. Auch andere Verfahren, so beispielsweise die "Microscopy Image Correction" basiert letztlich auf einer Korrektur des GFP Fluoreszenzsignals um den Wert der Autofluoreszenz.

5

Daneben wurden aufwendige Optimierungen an der eigentlichen Auswerteeinheit vorgenommen. So wird beispielsweise die konfokale Lasermikroskopie oder die Zwei- Photonen-Laserscan-Mikroskopie eingesetzt, um eine hohe Auflösung der Fluoreszenzsignale zu erhalten und sie somit möglichst einzelnen konkreten dreidimensionalen oder räumlichen Strukturen innerhalb der biologischen Probe zu ordnen zu können. Dieser letzte Ansatz geht auf Beobachtungen zurück, dass die Autofluoreszenz innerhalb der Probe meist nicht homogen verteilt ist.

Ein Großteil der Überlegungen zur Verbesserung der Auswertung eines GFP-Signals in einer *in vivo* Probe setzt daher an der Gestaltung des Messverfahrens sowie an einer Optimierung der Detektions- oder Auswerteeinheit an. (siehe dazu ausführlich: Billinton N und A.W. Knight: Seeing the Wood through the Trees: A Review Of Techniques for distinguishing GFP from Cellular endogenous Autofluorescence. Analytical Biochemistry 2001 (291), 175-197).

20

Daneben existieren nur wenige Ansätze, das GFP durch Mutagenese so zu verändern, dass die Absorption und die Emission in s längerwellige Licht verschoben wird und somit den kritischen Bereich der Autofluoreszenz verlässt. So wurde z. B. das sogenannten Red Fluorescent Protein (RFP oder DsRed) aus *Discosoma* mit einem Emissionsmaximum bei 583 nm isoliert, dessen Weiterentwicklung mRFP1 ein Absorptionsmaximum bei 619 nm zeigt. Diese Variante hat zwar - im Gegensatz zum ursprünglichen RFP - keinen störenden zweiten Peak bei 490 nm. Es ist aber durch eine demgegenüber geringere Photostabilität und Signalstärke gekennzeichnet (Zhang J., E. Campbell, A. Ting und Y. Tsien: Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology. Molecular Cell Biology 2002 (3), S. 906-918).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein alternatives Fluoreszenzprotein insbesondere für zellbiologische Untersuchungen, sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung bereitzustellen. Dieses Protein sollte insbesondere ein Absorptionsmaximum im längerwelligen Bereich aufweisen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Bereitstellung eines Phycocyanins oder funktionell aktiver Teile davon, wobei das Phycocyanin bzw. dessen erfindungsge-

mäße Teile im Vergleich zum nativen Phycocyanin eine Glycosylierung aufweisen. Des weiteren wird eine transformierte Eukaryontenzelle, insbesondere eine Hefezelle, bereitgestellt, die das erfindungsgemäße Phycocyanin bzw. dessen funktionsell aktive Teile exprimiert.

5

Bei Phycocyaninen handelt es sich um Phycobiliproteine, die als akzessorische Photosynthesepigmente aus Cyanobakterien, Rotalgen oder Cryptomonaden bekannt sind. In Cyanobakterien und Rotalgen liegen einzelne Phycobiliproteine überwiegend aggregiert zu großen Untereinheiten, den sogenannten Phycobilisomen, vor.

10

Die Phycobiliproteine gehören zu der Familie homologer Proteine, die jeweils aus einem eng miteinander verbundenen  $\alpha\beta$ -Heterodimer bestehen. Beide Untereinheiten - also sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit können ein oder mehrere Chromophoren enthalten. Die Qualität und Anzahl der kovalent an die Proteineinheit (Apo-Protein) gebunden Chromophore dient der Klassifizierung der Phycobiliproteine.

15

Die Phycocyanine tragen eine einzige Bilin-Einheit an der  $\alpha$ -Untereinheit und zwei Biline an der  $\beta$ -Untereinheit. Im Vergleich dazu sind beispielsweise Phycoerythrine durch zwei oder drei Biline an der  $\alpha$ -Untereinheit und drei an der  $\beta$ -Untereinheit charakterisiert. Allophycocyanine hingegen tragen an jeder Proteinuntereinheit nur jeweils ein Bilin.

20

Wie bereits erwähnt, werden die Biline aufgrund ihrer Struktur unterschieden. Bei allen Bilinen handelt es sich jedoch übereinstimmend um Chromophore aus einem linearen Tetrapyrrol, das über eine Thioetherbindung zwischen dem C3'-Atom des Bilins und einem Cysteinrest der Proteineinheit kovalent an das Apo-Protein gebunden ist. Die Anzahl der Thioetherbindungen kann jedoch variieren. So weisen einige Biline zwei Thioetherbindungen zum Apo-Protein auf. Ebenso kann die Konfiguration des C3'-Atoms R oder S sein.

25

Die spektroskopischen Eigenschaften der Phycobiliproteine werden wesentlich durch die Anzahl und die Lage der Doppelbindungen in dem Bilin bestimmt. So wird zwischen dem Phycocyanobilin (PCB), dem Phycobiliviolin (PXB), dem Phycoerythrobilin (PEB) und dem Phycourobilin (PUB) unterschieden. Die zwei Thioetherbindungen zum Apo-Protein aufweisenden PEB und PUB tragen die Bezeichnung DiCysPEB bzw. DiCysPUB.

Daher ist die Konformation des Bilin-Anteils für die spektralen Eigenschaften des Phycobiliproteins von großer Bedeutung. So zeigen Röntgenstrukturanalysen, dass das Bilin im Phycobiliprotein in der Regel eine möglichst gestreckte Konformation einnimmt. Liegt das Bilin dagegen frei in Lösung vor – wodurch es eine davon abweichende Konformation einnehmen kann - verschiebt sich das Absorptionsmaximum stärker in den UV-Bereich.

Das Phycocyanin ist – wie bereits erwähnt – durch ein Bilin an der  $\alpha$ -Untereinheit und zwei Biline an der  $\beta$ -Untereinheit gekennzeichnet. Bei dem Bilin der  $\alpha$ -Untereinheit handelt es sich stets um ein PCB. Die  $\beta$ -Untereinheit kann entweder zwei PCB oder aber ein PCB und PEB tragen. Im ersten Fall handelt es sich um das C-Phycocyanin (C-PC), während das zweite Molekül als R-Phycocyanin (R-PC) bezeichnet wird. Die beiden PC-Varianten unterscheiden sich allerdings in ihren spektralen Eigenschaften nicht wesentlich.

Die meisten Phycobiliproteine absorbieren im Bereich von 495-650 nm. Phycocyanin zeigt – je nach Literatur, Versuchsbedingungen und Ausgangsorganismus – ein Absorptionsmaximum bei 600-650 nm. Nach Tooley *et al* (Tooley A.J., Yuping A.C., Glazer A.N.: Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-Phycocyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host. PNAS 2001 Vol 19) 10560 – 10565) zeigt das Holo-CpcA (d.h. also die  $\alpha$ -Untereinheit des PC) ein Absorptionsmaximum von 619 nm und eine maximale Emission bei 641 nm.

Diese spektralen Eigenschaften des Phycocyanins erlauben eine klare Diskriminierung des eigentlichen Fluoreszenz-Meßsignals von dem störenden Hintergrundrauschen der Autofluoreszenz und begründen somit dessen besondere Eignung als Fluoreszenzmarker für *in vivo*-Untersuchungen. Die Autofluoreszenz beruht - wie bereits oben erwähnt - im wesentlichen auf Flavin- oder NADH- bzw. NADPH-Derivaten, die Absorption- und Emissionsmaxima bei 360-560 nm zeigen.

Die grundlegenden Untersuchungen zur Biosynthese des Phycocyanins wurden an der Rotalge *Cyanidium caldarium* gemacht. Dabei wurde durch  $^{14}\text{C}$ -Markierungen des Häms deutlich, dass die Biosynthese des Phycocyanins zunächst die Degradation des endogenen Häms zu Biliverdin IX $\alpha$  durch die Hämoxygenase 1 (HO1) voraussetzt. Dabei wird der Tetrapyrrolring linearisiert. In weiteren Schritten wird das Biliverdin zu 14,16 Dihydrobiliverdin IX $\alpha$  und anschließend zu 3 Z - Phycocyanobilin umgewandelt.

Diese letzten beiden Umwandlungen setzen jeweils die Gegenwart von reduziertem Ferredoxin voraus und werden durch die Ferredoxin Oxidoreduktase katalysiert. Das so entstandene PCB wird durch die heterodimere Phycocyanin  $\alpha$  PCB

5 Lyase an die  $\alpha$ -Untereinheit des Phycobiliproteins (Apo-CpcA) geknüpft. Damit entsteht die fertige Holo- $\alpha$ -Untereinheit (Holo-CpcA)

Die Biosynthese des Holo-CpcA umfaßt somit zunächst die Degradation und Umwandlung des Häms zum PCB und anschließend dessen enzymatische Bindung

10 an die Proteinuntereinheit. Entsprechend verläuft die Biosynthese der Holo- $\beta$ -Untereinheit (Holo-CpcB), wobei die Bindung der Bilin-Einheiten an das CpcB vermutlich zumindest teilweise nicht-enzymatisch erfolgt. Liegen sowohl das Holo-CpcA als auch das Holo-CpcB vor, dimerisieren diese zu einem "Monomer" des Phycocyanins.

15

Die vollständige Biosynthese des Holo-CpcA wurde erstmals in der photosynthetisierenden Blaualge *Synechocystis* sp. PCC 6803 erkannt und die dafür relevanten Gene identifiziert (Nakamura, Y., Kaneko T., Hirosewa M., Miyajima N., Tabata S. (1998) Nucleic Acids Res. 26, 63-67). Die heterodimere PCB Lyase wird von den

20 Genen cpcE und cpcE kodiert. Die Hämoxygenase wird durch hox1 und die Ferredoxin Oxidoreduktase durch das pcyA Gen kodiert. Das cpcA-Gen kodiert die  $\alpha$ -Untereinheit CpcA und das cpcB-Gen die  $\beta$ -Untereinheit CpcB des Phycocyanins.

25

Trotz des großen Bedarfs an Fluoreszenzmarkern mit den besonderen spektralen Eigenschaften des Phycocyanins für die Zellbiologie und der Kenntnis der an der Biosynthese beteiligten Proteine sowie deren Gene ist es bisher nicht gelungen, Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus – wie beispielsweise das Holo-CpcA oder das Holo-CpcB – rekombinant in Eukaryonten zu exprimieren.

30

In der Vergangenheit ist zwar die heterologe Expression des Holo-CpcA in *E. coli* gelungen (Tooley et. al. a.a.O.). Dazu wurden die Zellen mit zwei Plasmiden mit cpcA, cpcE und cpcF Gen bzw. hox1 und pcyA transfiziert. Nach Induktion der Genexpression erfolgte die Biosynthese des Holo-CpcA. Auch zeigte dieses Holo-CpcA vergleichbare spektrale Eigenschaften wie das native Holo-CpcA. Die Ausbeute an Holo-CpcA war aber gering, da nur etwa ein Drittel des verfügbaren Apo-CpcA tatsächlich zum Holo-CpcA umgesetzt wurde.

In ihren Untersuchungen haben Tooley *et al.* evaluiert, ob möglicherweise ein Mangel an verfügbarem endogenen Häm in *E. coli* für die reduzierte Konversion von Apo-CpcA zu Holo-CpcA ursächlich ist. Dazu haben sie den transformierten Zellen zusätzlich δ-Aminolävulinsäure angeboten. Die zusätzliche Gabe dieser 5 Schlüsselverbindung des Häm-Stoffwechsels hat jedoch nicht zu einer Erhöhung der Holo-CpcA Ausbeute geführt.

Die Autoren spekulieren daher darüber, ob die für die Expression in *E. coli* ungünstige Codonverwertung ("Codon Usage") der Gene *hox1*, *pcyA*, *cpcE* und *cpcF* 10 für die mangelhafte Ausbeute verantwortlich sein könnte. Des weiteren könnte eine ungleiche Anzahl der jeweils in einer *E. coli*-Zelle vorliegenden Plasmide - die entweder *hox1* und *pcyA* oder aber *cpcA*, *cpcE* und *cpcF* tragen - eine Rolle spielen (siehe dazu auch Tooley *et al.* a. a.O. Seite 10564 rechte Spalte oben).

15 Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits vor langer Zeit die Vorteile der Verwendung von Phycobiliproteinen als Marker für intrazelluläre Vorgänge *in vivo* erkannt und daher versucht, Systeme zur Bereitstellung von Holo-CpcA in Hefen zu etablieren. Dazu wurden beispielsweise die Gene *cpcE* und *cpcF* für die heterodimere PCB-Lyase sowie das *cpcA*-Gen zu Kodierung des Apo-α-CPCA in die Hefen kloniert. Durch eine anschließende Gabe exogenen PCB war beabsichtigt, ein 20 funktionelles Holo CpcA - das heißt also einen funktionell aktiven Teil des Phycocyanins - in den Hefen zu generieren. Dieser Versuch der semisynthetischen Bereitstellung des Holo-CpcA in Hefen schlug jedoch fehl. (Schröder B.G. (1997) Doctorial Dissertation (University of California, Berkeley): Phycobiliprotein: Bio-25 synthesis and Applications)

Die möglichen Ursachen für den fehlgeschlagenen Versuch, funktionell aktive Teile des Phycocyanins durch die Addition exogenen PCBs an rekombinant erzeugtes Apo-CpcA in Hefen zu generieren, wird von Schröder ausführlich diskutiert. So konnte er durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen ausschließen, 30 dass die fehlende Addition des PCB an CpcA durch einen möglicherweise fehlenden Import des externen PCB in die Zelle oder aber durch einen aktiven Export des zunächst importierten PCB aus der Zelle heraus bedingt war.

35 Er schloß aufgrund seiner Untersuchungen daher aus, dass die Additionsreaktion der in das Hefegenom einklonierten *CpcE* *CpcF* Lyase aufgrund einer unzureichenden Konzentration an PCB ausblieb. Er folgerte aus seinen Untersuchungen des weiteren, dass in der Hefe ein die Additionsreaktion hemmender Inhibitor vor-

handen sein muß, und verweist für die Zukunft auf die Möglichkeit, Hefemutaten zu identifizieren, die diesen Inhibitor nicht aufweisen.

Ferner spekuliert Schröder auf die Möglichkeit, nach einer Aufklärung des vollständigen Biosynthesewegs die dafür relevanten Gene in die Hefe einzuklonieren und somit eine vollständige *in vivo* Biosynthese zu erreichen (siehe zu der Diskussion dieses Problems auch Schröder a. a. O. Seite 77-79). Eine eindeutige Erklärung für das Scheitern seiner Bestrebungen zur Bereitstellung einer semi-synthetischen Biosynthese bleibt Schröder aber schuldig.

10

In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf hingewiesen, dass es Tooley *et al.* aber selbst nach der Aufklärung des Biosynthesewegs nicht gelungen ist, eine zufriedenstellende Expression in *E. coli* zu erreichen (siehe oben).

15 Vor dem Hintergrund dieses Stands der Technik ist es um so überraschender, dass nun erstmals die Transformation einer Eukaryontenzelle gelungen ist, die ein Holo-CpcA als funktionell aktives Teil eines Phycocyanins exprimiert. Dabei wird in diesem Zusammenhang unter einem "funktionell aktiven Teil" jedes Teil, Analogon oder Derivat des Phycocyanins verstanden, das zu mindestens einer der Phycocyanin- $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten (oder Teilen davon) eine strukturelle Homologie aufweist und in seinen spektralen Eigenschaften im wesentlichen denjenigen Eigenschaften des nativen Phycocyanins entspricht.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform exprimiert die erfindungsgemäße Eukaryontenzelle das Holo-CpcA. Dazu kann die Eukaryontenzelle vorzugsweise mit den Genen cpcE und cpcF für die PCB-Lyase, dem hox1 für die Hämoxxygenase, dem pcyA für die Ferrodoxin-Reduktase und dem cpcA für die  $\alpha$ -Untereinheit transformiert sein. Damit kann eine vollständig endogene Biosynthese des Holo-CpcA in einem heterologen eukaryontischen Wirt erreicht werden.

30

Ebenso ist es aber auch möglich, das Holo-CpcA über einen semisynthetischen Biosyntheseweg bereitzustellen. Dazu kann es ausreichen, das CpcA oder CpcB – oder zumindest den jeweils für die Addition des PCB relevanten Teils davon – sowie die PCB Lyase in der Eukaryontenzelle zu exprimieren und PCB exogen hinzuführen. Alternativ können auch ein oder mehrere der anderen für die Biosynthese relevanten Gene entweder einkloniert werden oder aber ihr jeweiliges Genprodukt extern hinzugefügt werden. Damit ist es möglich – in Abhängigkeit von der

jeweiligen konkreten Fragestellung des Versuchs — das System gezielt zu induzieren. Mit der anschließenden Isolierung des Holo-CpcA oder Holo-CpcB aus der Wirtszelle steht das erfindungsgemäß "funktionell aktive Teil" des Phycocyanins bereit.

5

In dem Fall, dass sowohl das Holo-CpcA als auch das Holo-CpcB in der Zelle exprimiert werden – entweder vollständig endogen oder aber semisynthetisch wie oben beschrieben – können die beiden Untereinheiten dimerisieren und ein komplettes Phycocyanin-Monomer bilden. Erfindungsgemäß kann somit nicht nur ein Teil des Phycocyanins, sondern auch ein vollständiges Phycocyanin bereitgestellt werden.

Das erfindungsgemäß bereitgestellte Phycocyanin bzw. dessen funktionell aktive Teile weisen ein Glycosylierungsmuster auf, das sie von dem jeweils nativen Protein oder der entsprechenden Proteinuntereinheit unterscheidet. So ist beispielsweise das in einem eukaryontischen Wirt exprimierte CpcA an dem Threonin der Position 6, dem Serin an Position 10 und dem Serin an Position 162 der Aminosäuresequenz über eine O-Verknüpfung glykosyliert. Diese Glykosylierungen liegen im nativen CpcA nicht vor.

20

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Fluoreszenzproteins besteht darin, dass sein Emissionsspektrum im Vergleich mit seinen bisher bekannten Expressionsformen eine Rotverschiebung zeigt. Bei einem pH von 8,0 liegt das Emissionsmaximum des Holo-CpcA bei 643 nm und damit um 2 nm weiter im längerwelligen Bereich als beispielsweise das in *E.coli* exprimierte CpcA. Selbst wenn dieser Unterschied quantitativ nicht groß ist, kann er in der Praxis aber dazu dienen, dieses Signal von Signalen anderer Fluoreszenzfarbstoffe zu unterscheiden.

30

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird das Holo-CpcA in einer transformierten Hefezelle exprimiert. Dazu eignet sich insbesondere der unter der Aufnahmenummer DSM 16134 am 15. Januar 2004 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegte Hefestamm.

35

Es hat sich gezeigt, dass die heterologe Expression von Holo-CpcA nicht nur abhängt von der erfolgreichen Klonierung der für die Biosynthese erforderlichen Gene in die Wirtszelle, sondern auch durch eine geeignete Wahl der Kultivierungsbedingungen der Wirtszelle beeinflussbar ist. Dabei können insbesondere

Kultivierungsbedingungen eine Rolle spielen, die die Konzentration an verfügbarem endogenen Häm in der Wirtszellen beeinflussen. So kann eine Stimulierung der Häm-Biosynthese oder aber eine Hemmung des zellulären Häm-Abbaus zu einer Erhöhung der endogenen Häm-Konzentration führen.

5

Die insgesamt 8 Schritte umfassende Biosynthese des Häm ist seit langem bekannt und die dafür in der Hefe verantwortlichen Gene sind bereits identifiziert (z.B. R. Labbe-Bois, P. Labbe: Tetrapyrrol and Heme biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: H.A. Dailey (Ed.) Biosynthesis of Heme and Chlorophylls, Mc Graw-Hill, New York, 1990, 235-286 oder A. Chelstowska, J. Rytka: Heme biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Postepy Biochem. 39 (1993) 173-185). Die Regulationsmechanismen dieses Syntheseweges sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es hat sich aber gezeigt, dass die Produktionsrate des Häm u.a. von der verwendeten Kohlenstoffquelle im Medium und der Sauerstoffverfügbarkeit während der Kultivierung abhängt. So führt die Gabe von Glucose zu einer Repression der Häm-Biosynthese. Gleicher gilt für andere von der Hefe fermentierbare Kohlenstoffquellen wie z.B. Galactose. Die Gabe von nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol stimuliert dagegen im Vergleich zu Glucose den Hämstoffwechsel um das 2 - 3-fache (M. Hoffmann, M. Gora, Rytka J: Identification of rate-limiting steps in yeast heme biosynthesis. Biochemical and Biophysical research Communications 310 (2003) 1247-1253; Chelstowska (1993)).

Somit ist es für die erfindungsgemäße Bereitstellung des rekombinanten Phycocyanins bzw. dessen Teile vorteilhaft, die transformierten Hefezellen in einem Medium mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu kultivieren, um die endogene Konzentration des verfügbaren Häm zu steigern.

Alternativ können in einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens Inhibitoren des Hämabbaus dem Kulturmedium zugesetzt oder in den Wirtsorganismus kloniert werden.

Bei dem Enzym HMX1 handelt es sich um ein Homolog der Hämoxigenase, das der unveränderten Hefe fehlt (Protchenko O., Philpott C.C. (2003) Regulation of Intracellular Heme Levels by HMX1, a Homologue of heme Oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC* 278:36582-36587). Da dieses Enzym über Eisen gehemmt wird, besteht die Möglichkeit, dieses Enzym in einem konkreten Kulturmedium zu hemmen, z. B. durch die Gabe von Eisen.

Die Konzentration an verfügbarem Häm kann erfindungsgemäß ebenso durch eine Überexpression der Schlüsselenzyme der Hämsynthese erfolgen. Dazu kann die Porphobilinogen Synthase, die Porphobilinogen Deaminase oder die Uroporphyrinogen III Decarboxylase überexprimiert werden (Hoffmann et al (2003) a.a.O.).

Ebenso kann es – bei der Verwendung des ADH-Promotors als Promotor der einklonierten Gene – vorteilhaft sein, die Aktivität des Promotors z.B. durch eine Erhöhung der Glucose-Konzentration zu steigern. Die Erhöhung der Glucosekonzentration zur Steigerung der Promotoraktivität steht zwar zunächst im Konflikt mit der damit verbundenen Repression des Hämstoffwechsels. Es hat sich aber experimentell bestätigt, dass insbesondere eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Medium von dem bei der Kultivierung von Hefen üblichen 2 % auf beispielsweise 13 % zu einer optimierten Ausbeute von rekombinantem Holo-CpcA mit einer Steigerung des Fluoreszenzsignals um das mehr als 7-fache führt (siehe unten).

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform wird das Kulturmedium mit 2 % Ethanol versehen. Es ist bekannt, dass Ethanol einerseits als nicht fermentierbare Kohlenstoffquelle den Hämstoffwechsel induziert (Hoffmann et al (293) a. a. O.), aber andererseits auch die Aktivität des ADH Promotors fördert (Ruohonen, L., Aalto, M.K., Keränen, S.: Modifications to the ADH1 promotor of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 1995 (39) 193-203)a.a.O.).

Erfindungsgemäß kann alternativ oder ergänzend vorgesehen werden, den Abbau des rekombinanten Phycocyanins in der Zelle bzw. dessen Teile zu hemmen oder zu verzögern. Da ein Stickstoffmangel einen verstärkten Abbau der Phycocyanin Hexamere begünstigt (Grossman AR (1990) Chromatic adaptation and the events involved in phycobilisome biosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 13:651 -666), kann eine Supplementierung mit Stickstoff dem Phycocyanin-Abbau entgegenwirken.

Wie bereits erwähnt, wird in einer Ausführungsform der Erfindung eine Hefezelle transformiert. Dazu ist es vorteilhaft, die einklonierten PC-Gene für die Expression in der Hefe zu optimieren, indem zunächst der GC-Gehalt der Gene auf einen durchschnittlichen Wert von 45% gebracht wird. So kann die genetische Stabilität

und die Halbwertzeit der mRNA im Wirtsorganismus verlängert werden.

Darüber hinaus kann die Effizienz der Expression noch gesteigert werden, indem die PC-Gene hinsichtlich ihrer Codon-Verwertung ("Codon Usage") auf den jeweiligen Wirtsorganismus eingestellt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Eukaryontenzelle mit einem oder mehreren Plasmiden, die eine oder mehrere der Oligonukleotisequenzen der SEQ. ID. No. 6 - 10 transformiert.

10 Für die erfolgreiche Transformation des eukaryontischen Wirts werden die ausgesuchten PC-Gene zunächst in einen Klonierungsvektor kloniert und können anschließend über einen Integrationsvektor in das Genom der Wirtszelle stabil integriert werden. Die Gene können dabei auf einen oder mehrere Klonierungsvektoren verteilt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist 15 die Klonierung aller 5 PC-Gene in nur ein Plasmid erfolgt.

Sofern die konstitutive Expression eines Gens auf dem Vektor oder in dem Genom gewünscht ist, kann diesem Gen ein konstitutiver Promotor - beispielsweise ein ADH-Promotor - vorgeschaltet sein. Es sind jedoch auch induzierbare Promotoren, 20 wie beispielsweise der GAL-Promotor möglich. Die Promotoren können sowohl jedem einzelnen Gen vorgeschaltet sein, als auch die gesamte Gruppe der Gene gemeinschaftlich regulieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform wurde ein ADH Promotor gewählt, um die 25 Expression der PC-Gene hox1, cpcE, pcyA und cpcF zu ermöglichen. Der ADH Promotor ist dabei jedem Gen jeweils vorgeschaltet. In dieser Ausführungsform wird das cpcA Gen über den GAL-Promotor reguliert. Damit kann ein induzierbares System für die Biosynthese des Phycocyanins oder des Holo- $\alpha$ -Phycocyanins geschaffen werden.

30 Selbstverständlich ist es alternativ auch möglich, das cpcA-Gen unter die Kontrolle des ADH Promotors und ein oder mehrere der übrigen Gene unter die Kontrolle des GAL Promotors oder eines beliebigen anderen Promotors zu stellen.

35 Sofern ein ADH1-Promotor verwendet wird, ist es von Vorteil, den ADH Promotor nicht in seiner ursprünglichen Länge von etwa 1500 bp zu verwenden, da sich erfahrungsgemäß die Aktivität des ADH1 Promotors über die Zeit reduziert. So konnte beobachtet werden, dass der vollständige Promotor im späten expo-

tiellen Wachstum der Zellen abschaltet.

Nach Untersuchungen von Ruohonen *et al.* ist diese Eigenschaft des ADH1 Promoters auf ein stromaufwärts gelegenes 700 bp Fragment zurückzuführen. Die 5 Deletion dieser Region hin zu einen "mittleren Promotor" von etwa 700 bp ist dagegen für eine hohe und stabile Expression der klonierten Gene geeignet. Die Publikation von Ruohonen *et al.* wird hinsichtlich der Struktur und Lage eines erfindungsgemäß verwendbaren ADH1 Promoters vollumfänglich in Bezug genommen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein ADH1 Promotor mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. No. 5 eingesetzt.

Da eukaryontische mRNA im Gegensatz zu prokaryontischer mRNA nicht polycistronisch ist, müssen die einklonierten Gene jeweils mit einer Terminationssequenz versehen sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Terminationssequenz nach Guo und Sherman eingesetzt (Guo, Z., Sherman, F. Signals sufficient for 3' end formation of Yeast mRNA. Mol Cell Biol 1996 (16), 2772-2776). Besonders bevorzugt ist die unter Ziffer 3 dargestellte Terminationssequenz SEQ. ID. No. 13.

#### Ausführungsbeispiel

##### 25 1. Klonierungsstrategie

(siehe auch Fig. 1 "Klonierungsstrategie: Aufbau und Klonierung der Gene/Vektoren")

##### 1.1. Klonierung und Synthese der Gene:

30 Da die Umgebung des Startcodons erhalten bleiben soll, kommen folgende Enzyme in Frage:

Enzym	Erkennungsseq.	Isoschizomere	kompatible Enden	Recut
BspHI	T CATG A A GTAC T		Ncol AflIII (A CATGT)	NlaIII

Ncol	C   CATG G G GTAC   C		AflIII PciI	BspHI	NlaIII
------	--------------------------	--	----------------	-------	--------

BspHI und Ncol sind kompatibel und schneiden nicht in den Gensequenzen.

Die Gene wurden über 5' Ncol oder BspHI und 3' Xhol in die Vektoren kloniert.

5 Hierzu erhielten die Gene 5' die jeweils nach Umgebung des Startcodons passende Restriktionsschnittstelle. Am 3'-Ende wurde die Restriktionsschnittstelle für Xhol angefügt. Hier wurde darauf geachtet, dass möglichst wenige Aminosäuren durch die Klonierung zusätzlich in die Sequenz eingefügt wurden. Außerdem durfte durch das Anfügen der Xhol-Schnittstelle kein Frameshift entstehen. Dem 10 wurde durch das Einfügen der Basen AA vor der Schnittstelle und dem Anhängen eines A nach der Schnittstelle Rechnung getragen. Hierdurch wurde an jedes Gen die Aminosäuresequenz NSR angehängt, bei der sichergestellt wurde, dass sie nicht durch seltene Codons codiert wird.

15 **1.2. Klonierung und Synthese der Vektoren:**

Die Vektoren sollen ein nachfolgendes Ausschneiden des gesamten Gens wahlweise mit und ohne His-Tag erlauben, um einen Nachweis der Expression der Einzelgene zu ermöglichen. Zur Klonierung der Gene hintereinander wurde der HisTag jedoch weggelassen, um eventuelle Probleme mit der zusätzlichen Sequenz zu vermeiden.

Somit enthalten die Vektoren Ncol-Xhol oder BspHI-Xhol je mit und ohne HisTag sowie mit und ohne Terminationssequenz. Durch das vorliegende Design der Vektoren können die Gene in diese einkloniert und danach mit/ohne HisTag, 25 Stopcodon und Terminationssequenz ausgeschnitten und weiter kloniert werden.

Als Ausgangsvektor, in den die synthetisierten mcs und die Gene hintereinander einkloniert wurden, diente pSL1190 (s. Karte von pSL 1180 (Fig. 2); die Vektoren pSL1190 und pSL1180 unterscheiden sich lediglich in der Orientierung der mcs). 30 Die bei der Synthese der vier verschiedenen mcs-Sequenzen berücksichtigten Restriktionsschnittstellen sind in der Figur durch Kästen kenntlich gemacht – so sind mehr Möglichkeiten bei der Klonierung vorhanden. Die letztlich bei der Klonierung der PC-Gene verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in der Figur zusätzlich durch einen den jeweiligen Kasten unterlegenden Strich markiert.

35

Beim Design der mcs für die Vektoren wurde auf folgende Dinge geachtet:

- die verwendeten Enzyme dürfen nicht in den Promotorsequenzen schneiden
- sie dürfen nicht im Rückgrat des Vektors schneiden
- der Abstand zwischen den Restriktionsschnittstellen muss groß genug sein, damit benachbarte Enzyme beide schneiden können
- die mcs müssen in den pSL1190 kloniert werden können - hierzu werden die Enzymschnittstellen EcoRI und HindIII an den Enden der mcs vorgesehen
- es müssen Schnittstellen zur Integration der gesamten PC-Kassette (alle 5 Gene hintereinander kloniert) in den Vektor pRS306 vorliegen (hier: SacI/Sall)
- In dem Vektor pRS306 muss die Möglichkeit zur Linearisierung im URA3-Gen (Selektionsmarker) bestehen, damit der Vektor integrieren kann und die Kassette genomisch integriert vorliegt.

15 Die Sequenzen der mcs der Vektoren sind beigefügt (SEQ. ID. No. 1 - SEQ. ID No. 4).

Aus den Vektoren 656 und 660 (pSL1190 mit synthetisierter mcs, die BspHI-site enthält) müssen, um eine Klonierung mit BspHI durchführen zu können, drei Schnittstellen dieses Enzyms aus dem Rückgrat des Vektors entfernt werden. Hierzu wird der Quik Change Multi Site Directed Mutagenesis Kit von Stratagene eingesetzt und der Erfolg des Experimentes durch Restriktionsanalysen der entstandenen Vektoren verifiziert.

25 Entstandene Klone bei der Vektorklonierung: (die weiter verwendeten Klone sind **fett** gekennzeichnet)

Klon-Nr.: B	Klonbeschreibung
647	GeneArt mcs-A = 03-200; Ncol/His-Tag in PCR-Script; <b>647</b>
648	GeneArt mcs-B = 03-201; BspHI/His-Tag in PCR-Script; <b>648</b>
649	GeneArt mcs-C = 03-215; Ncol/ohne His-Tag in PCR-Script; <b>649</b>
650	GeneArt mcs-D = 03-216; BspHI/ohne His-Tag in PCR-Script; <b>650</b>
651 bis 653	GeneArt mcs = 03-199 in pRS306; <b>651</b>
654, 655	GeneArt mcs-A = 03-200 = Ncol/His-Tag in pSL1190, <b>654</b>
656, 657	GeneArt mcs-B = 03-201 = BspHI/His-Tag in pSL1190 <b>656</b>
658, 659	GeneArt mcs-C = 03-215 = Ncol/ohne His-Tag in pSL1190; <b>658</b>
660, 661	GeneArt mcs-D = 03-216 = BspHI/ohne His-Tag in pSL1190; <b>660</b>

682 bis 689	QuikChange mit B656 zur Entfernung BspHI sites; <b>684, 685</b>
690 bis 697	QuikChange mit B660 zur Entfernung BspHI sites; <b>690, 693</b>

### 1.3. Wahl und Klonierung des ADH Promotors:

5 Der ADH-Promotor (Alkohol-Dehydrogenase) ist in vielen Klonierungsvektoren vorhanden und führt dort zu einer konstitutiven Expression nachgeschalteter Gene. Oftmals ist jedoch bei seiner Verwendung ein Rückgang der Expressionsrate des klonierten Gens bis hin zu einem kompletten Abschalten der Expression nach etwa 3 Tagen festzustellen.

10

Es hat sich aber gezeigt, dass ein ein 700 bp langes Stück des originären (kompletten) Promotors umfassender ADH Promotor zu einer Expression der klonierten Gene während des gesamten Wachstumszyklus der Hefe führt (Ruohonen et al. (1995) a.a.O.).

15

Dieses Stück des Promotors war der Ausgangspunkt für den erfindungsgemäß verwendeten ADH-Promotor, wobei allerdings bei der Klonierung des Promotors die Primer für die PCR so gewählt wurden, dass ein ADH-Fragment von insgesamt 719 bp entstand (siehe SEQ. ID. No. 5).

20

Die Synthese des ADH Promotors wurde mittels PCR aus dem Genom von *S. cerevisiae* Y190 durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in einer Drei-Fragmente-Ligation mit dem fraglichen Gen und dem Vektor zusammen. Hierfür wurde immer der gleiche reverse-Primer eingesetzt, der eine Ncol-Schnittstelle besitzt, da Ncol und BspHI kompatibel sind. Der forward-Primer besitzt jeweils eine andere angehängte Restriktionsschnittstelle, die je nach Klonierungsschritt ausgewählt wird.

25 Sequenzen der verwendeten Primer (die Restriktionsschnittstelle ist jeweils unterstrichen): Die zusätzlichen Basen werden benötigt, damit das Enzym das PCR-  
30 Fragment schneiden kann:

ADH-Sacl-for	CAATTAGAGCTCATATC <u>CC</u> TTGTTGTTCCGGGTG
ADH-SaclI-for	ATCCCCGCGGATATC <u>CC</u> TTGTTGTTCCGGGTG
ADH-NotI-for	AAGGAAAAA <u>AGCGGCCG</u> CATATC <u>CC</u> TTGTTGTTCCG GGTG

ADH-XbaI-for	AGCTCTAGAATATCCTTTGTTGTTCCGGGTG
ADH-BglII-for	CGAAGATCTATATCCTTTGTTGTTCCGGGTG
ADH-NcoI-rev	GTAAG <u>CCATGGT</u> TATGAGATAGTTGATTGTATGCTT GG

## 2. Optimierung der Codon-Usage

Die Codon-Usage wurde für die Häufigkeit der Codonnutzung (Codon-Usage) von *S. cerevisiae* optimiert. Der GC-Gehalt wurde, wenn möglich, auf einen durch-

5 schnittlichen Wert von ca. 45 % eingestellt, um die genetische Stabilität der mRNA-Halbwertzeit zu steigern.

Darüber hinaus wurden folgende für die Klonierung vorgesehenen Restriktions-schnittstellen aus den Genen entfernt:

10

Gen	Restriktionsenzym	Position (bp)
CpcA	KpnI	312
CpcE	NheI	779
	YbaI	493
	HpaI	366
	HpaI	549

Es wurden für die Klonierung der für die Expression des Holo-CpcA erforderlichen Gene ("PC-Gene") folgende Sequenzen verwendet:

Gen	SEQ. ID. No.
cpcA	SEQ. ID. No. 6
cpcE	SEQ. ID. No. 7
cpcF	SEQ. ID. No. 8
hox1	SEQ. ID. No. 9
pPcyA	SEQ. ID. No. 10
cpcB	SEQ. ID. No. 11

15

Sofern ein Holo-CpcB exprimiert werden soll, kann alternativ zum cpcA das cpcB-Gen einkloniert werden (SEQ. ID. No. 11). Das codiert eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ. ID. No. 12.

## 20 3. Wahl der Terminationssequenz

Da eukaryotische mRNAs im Gegensatz zu prokaryontischen nicht polycistronisch sind, muß eine Termination nach jedem Gen stattfinden. Guo und Sherman (1996, a.a.O.) beschreiben eine synthetische DNA-Sequenz, die für die Bildung eines 3'-Endes ausreicht und aus "efficiency element", "positioning element" und "poly(A) region" besteht.

5 Für unsere Zwecke wurde die XbaI-Schnittstelle entfernt und die Spacer-Region zwischen "efficiency element" und "positioning element" wie folgt gewählt: ACTCTGTAGA (statt ACTGTCTAGA; XbaI-Schnittstelle (SEQ. ID. No. 13)).

10 **4. Klonierung der Einzelgene und Test der Expression der Einzelgene**  
Das Vorgehen bei der Klonierung der Einzelgene sowie für den Nachweis ihrer erfolgreichen Expression ist schematisch in Fig. 3 dargestellt. Die Darstellung bezieht sich exemplarisch auf den Klon B654:pSL1190 mit Ncol-Schnittstelle und  
15 HisTag.

Die Linearisierung des fertigen Vektors erfolgte mit SstI. Die Transformation erfolgte in den Hefestamm Y190 mit URA Defizienz.

20 Zunächst wurden Vortests mit zwei anderen Fluorophoren durchgeführt, um zu testen, ob eine Expression der Gene hinter dem gewählten ADH-Promotor und mit der eingesetzten Terminationssequenz erfolgt.

25 Für diesen Nachweis wurden die Gene einzeln jeweils mit dem ADH-Promotor in den Vektor pRS306 kloniert. Dabei handelt es sich um einen Integrationsvektor, so dass die Gene anschließend in das Genom der Hefe integriert werden können. Damit entspricht die Situation im wesentlichen dem angestrebten Ziel, nämlich dass die fünf für das Holo-CpcA relevanten Gene ("PC-Gene") hintereinander liegen. Als Schnittstellen zur Integration des Gens mit Promotor in den Vektor  
30 pRS306 wurde SacI/Sall gewählt, da so am meisten Fremdsequenz in die Hefe eingebracht werden kann.

35 Hierzu wurden die Gene zuerst in den passenden Vektor (pSL1190 mit BspHI oder Ncol-site und HisTag) kloniert, um anschließend in einer Drei-Fragmente Ligation mit dem ADH-Promotor ligiert zu werden.

Zur Durchführung der Drei-Fragmente-Ligation wurden die eingesetzten DNA-Mengen mittels Agarosegel mit mitgeführtem Marker bestimmt. Danach wurden

die eingesetzten DNA-Mengen auf molarer Ebene ausgerechnet. Dem Vektor wurden 25 fmol und den beiden Inserts je 125 fmol eingesetzt.

Das Zellpellet nach der Kultivierung von Protein-exprimierenden Hefen wurde mit 5 *glass beads* und Vortexer aufgearbeitet. Hierbei wurden denaturierende Bedingungen gewählt. Bei der Aufreinigung des HisTag tragenden Proteins wurden die Vorschriften des Herstellers der Ni-NTA-Säulchen eingehalten.

#### 5. Klonierung der Gene für das Holo-CpcA hintereinander

10 Das Vorgehen für die Klonierung der PC-Gene hintereinander ist schematisch in der Fig. 4a bis 4c dargestellt. Die Karte des Vektors mit den einklonierten PC-Genen zeigt Fig. 5. Die Sequenzdaten für den Vektor enthält SEQ. ID. No. 14. Sofern dem CpcA der Gal-Promotor vorgeschaltet ist, zeigt der Vektor einen Aufbau nach Fig. 6.

15 Die Gene wurden in pSL1190 mit synthetisierter mcs ohne HisTag kloniert. Danach wurden diese Gene mit passenden Enzymen herausgeschnitten und zusammen mit dem ADH-Promotor hintereinander in den Vektor pSL1190 gesetzt. Dabei wurde der Erfolg der Klonierungen mittels Bakterienkolonie-PCR für das 20 jeweilige Gen nachgewiesen und die Identität der isolierten DNA wurde durch Testcuts verifiziert. Zusätzlich wurde der Promotoranteil der jeweils entstandenen Vektoren sequenziert (AGOWA), da dieser durch PCR erzeugt wurde (variierender forward primer mit verschiedenen Restriktionsenzymen) und Fehler vorhanden sein könnten. Für diese PCR-Anwendungen wurde die proof-reading-Polymerase 25 Pfu (Promega) eingesetzt.

Nachdem die Gene hintereinander in dem Vektor pSL1190 vorlagen, wurde die gesamte Kassette über die Restriktionsschnittstellen SacI/Sall in den Integrationsvektor pRS306 kloniert. Bei diesem Klonierungsschritt wurden das cpcA-Gen mit 30 passenden Primern und der Vektor pRS306 mittels einer PCR mit Primern, die ein Stück aus dem URA3-Selektionsmarker amplifizieren, in den transformierten Bakterienkolonien nachgewiesen.

Sequenz der zum Nachweis der klonierten Gene/Integrationsvektor pRS306 verwendeten Primer:

		Länge des Fragments

cpcF-for	TGATTCAAGCTGTTGAAACC	361 bp
cpcF-rev	GATTGCCATCTCAAGAAACC	
hox-for	CTGCTGGTCAAGCATAACG	413 bp
hox-rev	GGTAGCCAAACCAACTTCG	
cpcA-for	CTTCGGTAGATTGAGACAAGC	414 bp
cpcA-rec	CAAAGCGTTAATAGCGTAATCC	
pcyA-rev	TTGACCAACTCTCTTGATGC	579 bp
pcyA-rev	AGCTTCAGACAATGGTTCAGC	
cpcE-for	AAGATGAAACCGATAGATCACC	609 bp
cpcE-rev	AAGCCTTAGATTTCAGAAGATGC	
URA-pRS-for	GAACGTGCTGCTACTCATCC	613 bp
URA-pRS-rev	CGTCTCCCTTGTCACTAAACC	

Um das Holo-Protein mittels Western-Blot und Immunodetektion gegen den HisTag nachweisen zu können, wurde das cpcA-Gen mit HisTag hinter die Kassette mit den restlichen Genen gesetzt und dann diese vollständige Kassette in 5 pRS306 kloniert. Nach der Transformation mit nachfolgender Expression des Proteins in der Hefe wurde das Protein aufgereinigt und in einem Western Blot dargestellt (Fig. 7).

Western Blot:

10

Für den Western Blot wurde als primärer Antikörper der *Mouse Anti Histidine Tag* (Serotec) 1:250 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper diente *Goat Anti Mouse Alkaline Phosphatase* (Dianova) 1:5000. Die Detektion erfolgte mit BCIP/NBT-Blue Liquid (Sigma).

15

Als Marker wurde der prestained SDS-Gel Marker (Invitrogen) verwendet.

**6. Spektrum des erfindungsgemäßen Holo-CpcA**

Das Spektrum (Fig. 8) des erfindungsgemäßen Holo-CpcA wurde in folgendem 20 Puffer aufgenommen:

Lysepuffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
25 10 mM Imidazol

pH 8,0

Elutionspuffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5 300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0

Der Lysepuffer und der Elutionspuffer lag en im Verhältnis 60% zu 40% vor.

10

**7. Hefestamm und Kultivierungsbedingungen**

Als Wirtsorganismus für die erfindungsgemäße heterologe Expression der PC-Gene wurde eine Uracil defiziente Variante des Y190 Stamms der Hefe verwendet. Der Hefestamm Y 190 zeigte ursprünglich folgenden Genotyp: MATa, leu2-3,

15 leu2-112, ura3-52, trp1-901, his3-Δ200, ade2-101, GAL4-Δgal80-Δ, URA3::GAL-LacZ, LYS::GAL-HIS3, cyh<sup>r</sup>.

Zur Bereitstellung einer Uracil defizienten Y190 Hefe wurden aus diesem Stamm nach der Methode von Boeke *et al.* [Boeke, J., Lacroute, F. and Fink, G. R (1984).

20 A positive selection for mutants lacking orotidine-5-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-Fluoro-orotic acid resistance. Mol. Gen. Genet 197, 345-346] Hefezellen selektiert, die eine Deletion des URA3-Gens aufweisen.

25 Diese URA3 Deletionsmutanten wurden auf YPAD-Medium oder auf beliebigen synthetischen Komplett-Medien kultiviert. Es hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, anstelle der in der Literatur vorgeschlagenen 2 %-igen Glucose-Konzentration eine bis zu 13 %-ige Glucosekonzentration zu verwenden. Es sind aber alle Konzentrationen zwischen 2 und 20 % möglich.

**Patentansprüche:**

1. Rekombinante Eukaryontenzelle synthetisierend funktionell aktives Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus.  
5
2. Rekombinante Eukaryontenzelle synthetisierend Holo-CpcA und/oder Holo-CpcB.  
10
3. Rekombinante Eukaryontenzelle nach Anspruch 1 oder 2 exprimierend die heterodimere PCB Lyase sowie das Apo-CpcA und/oder das Apo-CpcB.  
15
4. Rekombinante Eukaryontenzelle nach Anspruch 3 exprimierend des weiteren eine heterologe Hämxygenase und/oder eine heterologe Ferredoxin Oxido-reduktase.  
20
5. Rekombinante Eukaryontenzelle nach einem der Ansprüche 3 oder 4, **gekennzeichnet durch** eines oder mehrere der Gene hox 1, pcyA, cpcE, cpcF und cpcA.  
25
6. Rekombinante Eukaryontenzelle nach Anspruch 5 transformiert mit einem Vektor umfassend mindestens ein Insert mit einer der folgenden Oligonukleotidsequenzen gemäß einer der SEQ. ID. No. 6 - SEQ. ID. No. 10 oder mit einer dieser Sequenzen komplementären Strang hybridisierenden Oligonukleotiden.  
30
7. Rekombinante Eukaryontenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens eines der Gene von einem ADH Promotor reguliert wird, der upstream von ~700 bp deletiert ist.  
35
8. Rekombinante Eukaryontenzelle nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle Gene von einem ADH Promotor reguliert werden, der upstream von ~700 bp deletiert ist.  
35
9. Rekombinante Eukaryontenzelle nach Anspruch 7 oder 8, **gekennzeichnet durch** einen ADH Promotor mit der Oligonukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. No. 5 oder mit einer mit **dem** dazu komplementären Strang hybridisierenden

Oligonukleotidsequenz.

10. Rekombinante Eukaryontenzelle nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine Hefezelle ist.

5

11. Hefezelle mit der DSMZ Aufnahmenummer DSM 16134.

12. Vektor umfassend Inserts codierend für eine Hämoxxygenase, eine Ferredoxin Oxidoreduktase, eine heterodimäre PCB Lyase und das Apo-CpcA 10 oder Apo-CpcB.

10

13. Vektor nach Anspruch 12, **gekennzeichnet durch** Inserts mit den Genen hox1, pcyA, cpcE, cpcF und cpcA, wobei das cpcA auch durch cpcB ersetzt werden kann.

15

14. Vektor nach Anspruch 11, **gekennzeichnet durch** eine oder mehrere der Oligonukleotide gemäß einer der SEQ. ID. No. 6 - SEQ. ID. No. 10 oder mit einer dieser Sequenzen komplementären Strang hybridisierenden Oligonukleotiden.

20

15. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens eines der Gene von einem ADH Promotor reguliert wird, der upstream von -700 bp deletiert ist.

25

16. Vektor nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle Gene von einem ADH Promotor reguliert werden, der upstream von -700 bp deletiert ist.

30

17. Vektor nach Anspruch 15 oder 16, gekennzeichnet durch einen ADH Promotor mit der Oligonukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. No. 5 oder mit einer mit dem dazu komplementären Strang hybridisierenden Oligonukleotidsequenz.

18. Vektor mit einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. No. 14.

35 19. Verfahren zur Herstellung eines Phycocyanins oder eines funktionell aktiven Teils davon, insbesondere Holo-CpcA oder Holo-CpcB umfassend folgende Schritte:

- Transformation einer eukaryontischen Wirtszelle mindestens mit cpcA oder cpcB;
- ggf. Addition eines Phycocyanobilins (PCB) und/oder der PCB Lyase

5

- Isolierung des Phycocyanins, des Holo-CpcA und/oder des Holo-CpcB aus der Wirtszelle.

10

20. Verfahren nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass zusätzlich auch eines oder mehrere der Gene hox1, pcyA, cpcE und/oder cpcF rekombinant exprimiert werden.

15

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 oder 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die endogene Häm konzentration in der Wirtszelle erhöht wird.
22. Verfahren nach Anspruch 19 bis 21, **gekennzeichnet durch** die Stimulierung des endogenen Hämstoffwechsels in der Wirtszelle.

20

23. Verfahren nach Anspruch 22, **gekennzeichnet durch** die Verwendung einer nicht von der Wirtszelle fermentierbaren Kohlenstoffquelle.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, **gekennzeichnet durch** eine Inhibierung des endogenen Hämabbaus in der Wirtszelle.

25

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 24, **gekennzeichnet durch** die Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium der Wirtszelle auf eine Konzentration, die die Aktivität des ADH-Promotors stimuliert.

30

26. Verfahren nach Anspruch 25, **gekennzeichnet durch** die Gabe von mindestens 13 % Glucose.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 26, **gekennzeichnet durch** eine 2 %-ige Ethanolkonzentration im Kulturmedium der Wirtszelle.

35

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 27, **gekennzeichnet durch** eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 26, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Transformation mit Hilfe eines Vektors nach einem der Ansprüche 12 bis 19 erfolgt.

5 30. Rekombinantes Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus, hergestellt nach einem der Ansprüche 19 bis 29.

31. Rekombinantes Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus nach Anspruch 30, **gekennzeichnet durch** eine Glykosylierung.

10 32. Rekombinantes Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus nach einem der Ansprüche 30 oder 31, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Glykosylierung an mindestens einer der Position 6, 10 oder 162 der Aminosäuresequenz vorliegt.

15 33. Rekombinantes Phycocyanin oder funktionell aktive Teile daraus nach einem der Ansprüche 30 bis 32, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Emissionsmaximum im Vergleich zum nativen Phycocyanin, insbesondere zum native Holo-CpcA bei pH 8 in den längerwelligen Bereich verschoben ist.

20 34. Rekombinantes Holo-CpcA mit einem Emissionsmaximum bei pH 8 von 643 nm.

25 35. Fusionsprotein enthaltend ein rekombinantes Phycocyanin oder funktionell aktive Teile davon, insbesondere rekombinantes Holo-CpcA, nach einem der Ansprüche 30 bis 34.

30 36. Antikörper oder Fragmente davon, **dadurch gekennzeichnet**, dass er spezifisch ein rekombinantes Phycocyanin nach einem der Ansprüche 30 bis 34 erkennt.

37. Antikörper oder Fragmente davon, **dadurch gekennzeichnet**, dass er spezifisch funktionell aktive Teile des rekombinantes Phycocyanins nach einem der Ansprüche 30 bis 34, insbesondere rekombinantes Holo-CpcA, erkennt.

1

## Klonierungsstrategie – Aufbau und Klonierung der Gene / Vektoren

Gene:	PC-Gen	XbaI
	Ncol oder BspHI	Ncol: CCATGG BspHI: TCATGA

Wektoren:

$\text{H}-\text{Ncol-Xhol}-\boxed{\quad}-\text{TAA}-\boxed{\quad}\text{S-N-X-B-Sal}$   
 His T

$\text{H}-\text{Ncol-Xhol}-\text{TAA}-\boxed{\quad}\text{S-N-X-B-Sal}$   
 His T

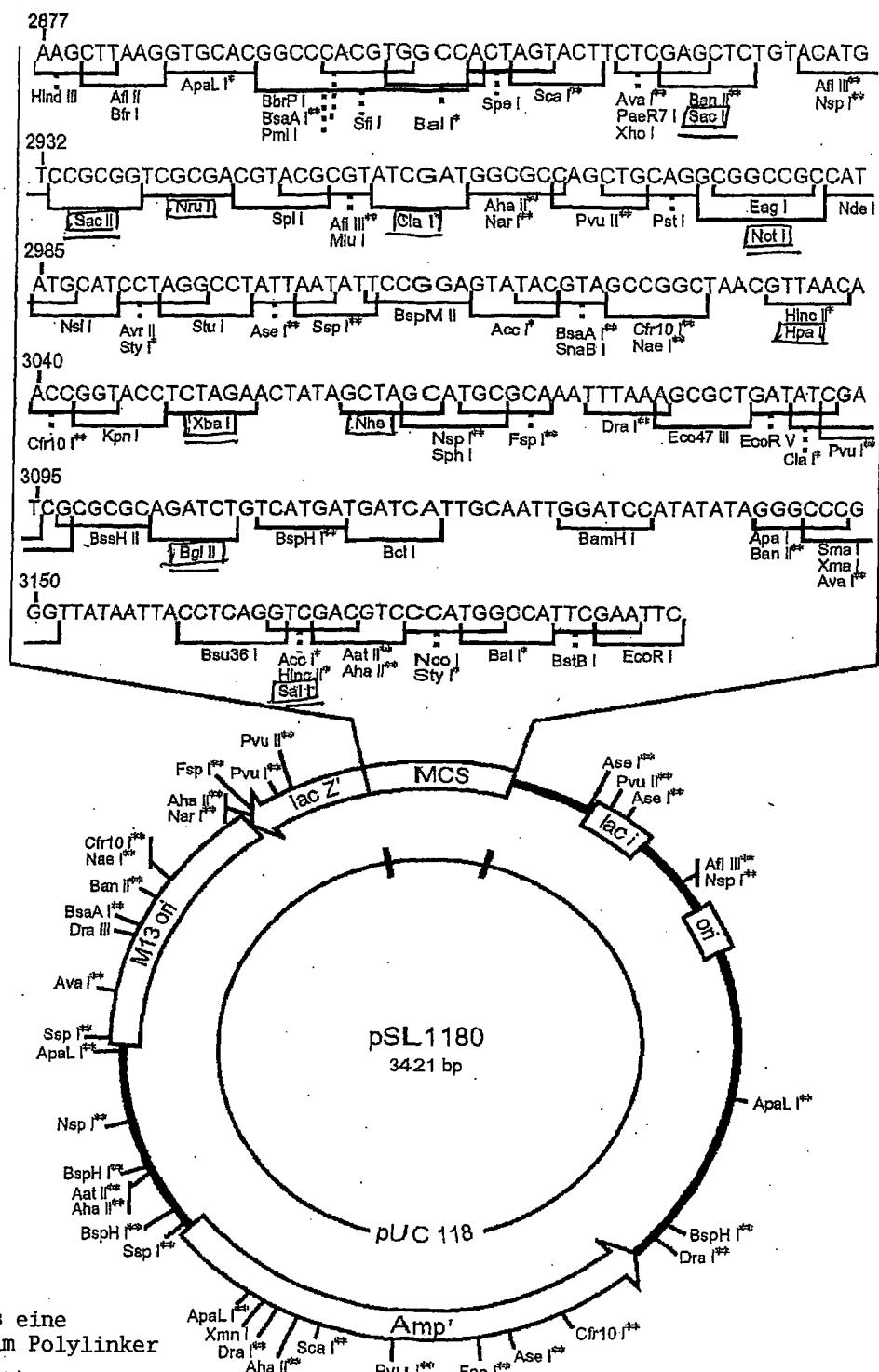
$\text{H}-\text{BspHII-Xhol}-\boxed{\quad}-\text{TAA}-\boxed{\quad}\text{S-N-X-B-Sal}$   
 His T

$\text{H}-\text{BspHII-Xhol}-\text{TAA}-\boxed{\quad}\text{S-N-X-B-Sal}$   
 His T

E S: SacI  
 N: NotI  
 X: XbaI  
 B: BglII  
 His: HisTag  
 T: Terminationssequenz

Fig. 2

2/10



\*Mehr als eine Stelle im Polylinker

\*\*Stelle(n) im Polylinker und im Plasmid

3  
五

## Vorgehen bei der Klonierung – Test der Expression der Einzelgene

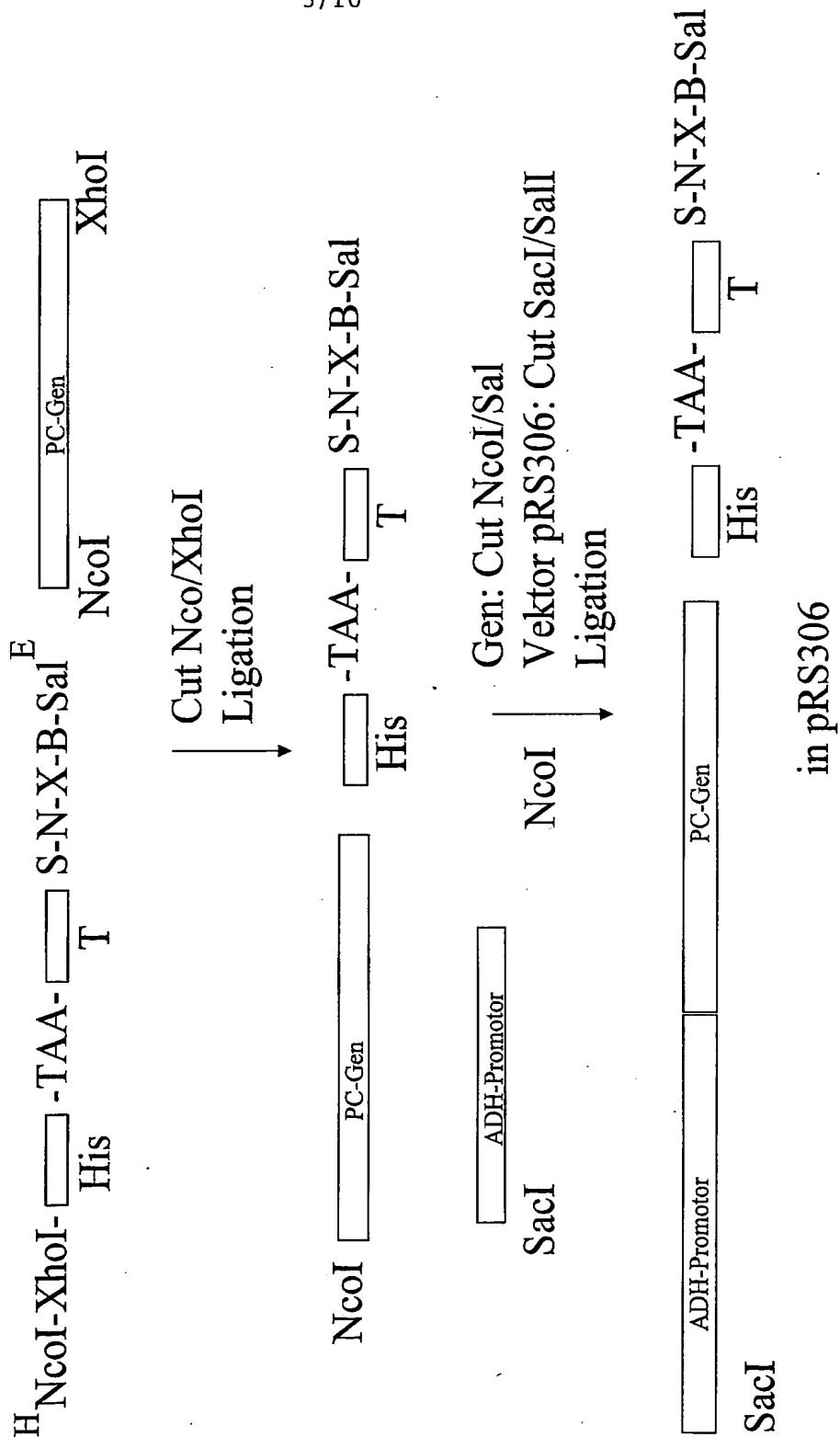


Fig. 4 a

## Vorgehen bei der Klonierung – Klonierung der Gene hintereinander

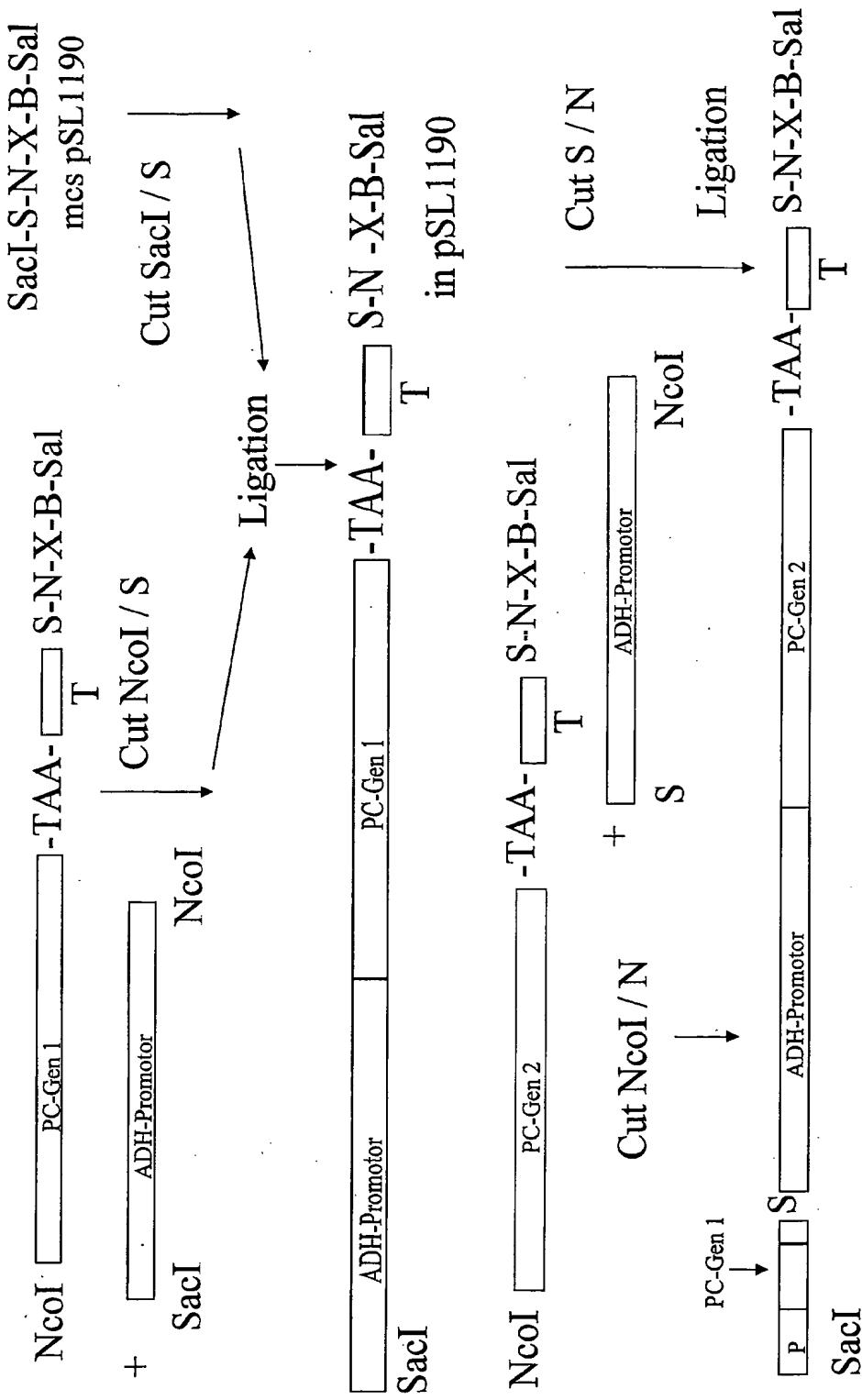
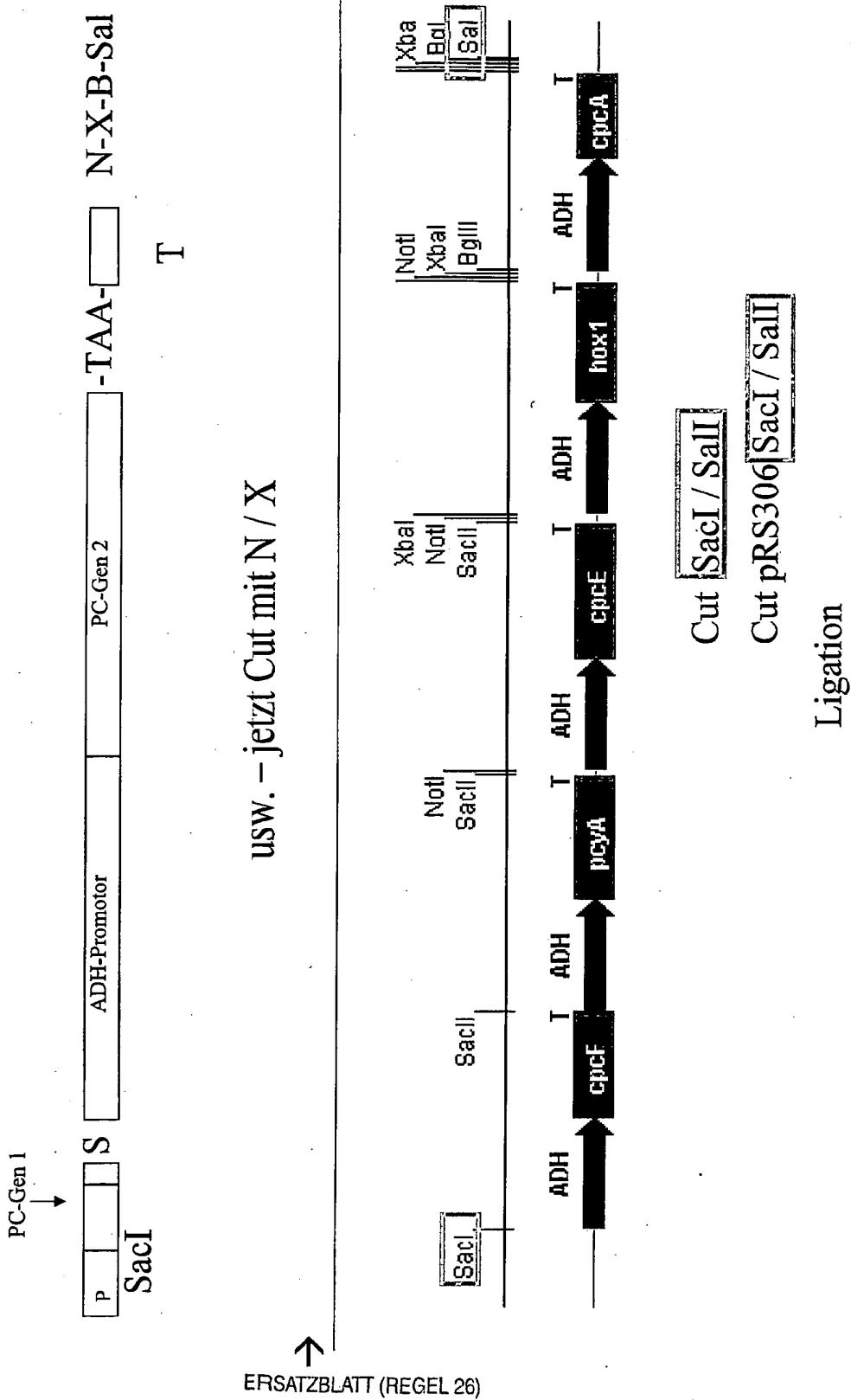


Fig. 4 b

### Vorgehen bei der Klonierung – Klonierung der Gene hintereinander



**Fig. 4c**

- 1) ADH-Promotor (SacI/ NcoI, 1) plus cpcF aus 706 (NcoI/SacII, 4) in pSL1190 (SacI/ SacII, 4)
- 2) ADH-Promotor (SacII/ NcoI, 4) plus pcyA aus 711 (NcoI/NotI, 3) in pSL1190 (SacII/ NotI, 4) mit cpcF
- 3) ADH-Promotor (NotI/ NcoI, 3) plus cpcE aus 714 (BspHI/ XbaI, 2) in pSL1190 (NotI/ XbaI, 3) mit cpcF und pcyA
- 4) ADH-Promotor (XbaI/NcoI, 2) plus hox1 aus 808 (BspHI/ BglIII, seq) in pSL1190 (XbaI/ BglIII, 2) mit cpcF und pcyA und cpcE
- 5) ADH-Promotor (BglIII/NcoI, 3) plus cpcA aus 703 (BspHI/ SalI, seq) in pSL1190 (BglIII/ SalI, seq) mit cpcF und pcyA und cpcE und hox1  
Gesamte Kassette aus pSL1190 (SacI/SalI, seq) in pRS306 (SacI/ SalI, seq) → Test der konstitutiven PC-Expression
- 6) GAL-Promotor (BglIII/NcoI, 3) plus cpcA aus 703 (BspHI/ SalI, seq) in pSL1190 (BglIII/ SalI, seq) mit cpcF und pcyA und cpcE und hox1  
Gesamte Kassette aus pSL1190 (SacI/SalI, seq) in pRS306 (SacI/ SalI, seq) → Test der regulierbaren PC-Expression

Fig. 5

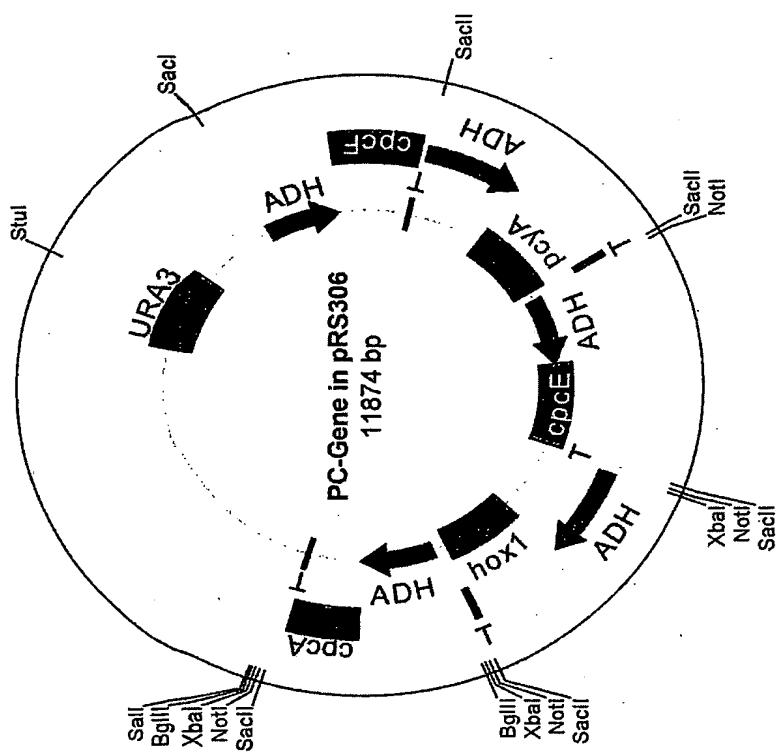


Fig. 6

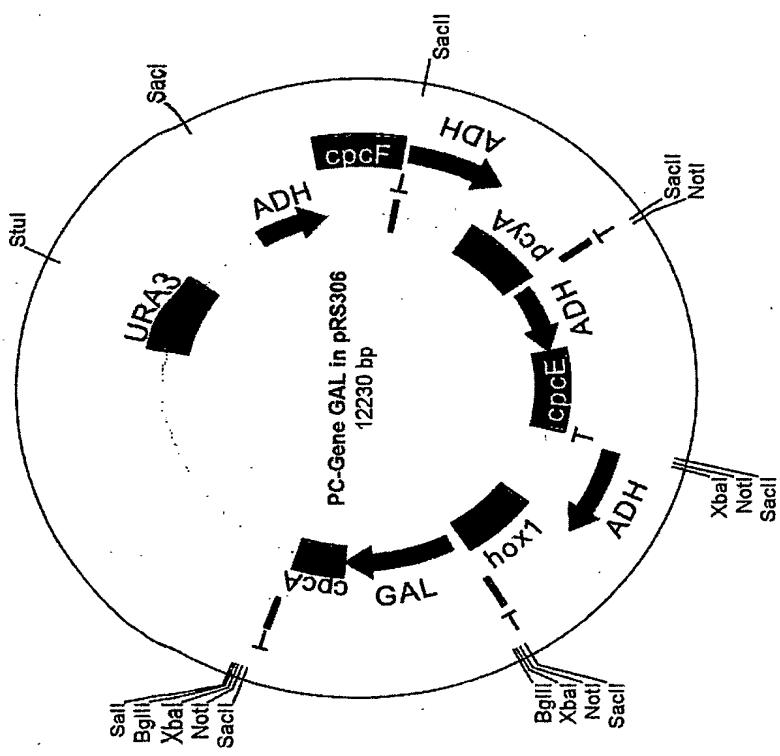


Fig. 7

Holo CpcA

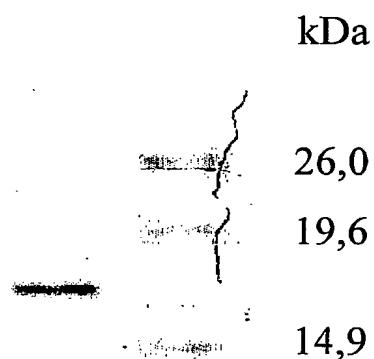
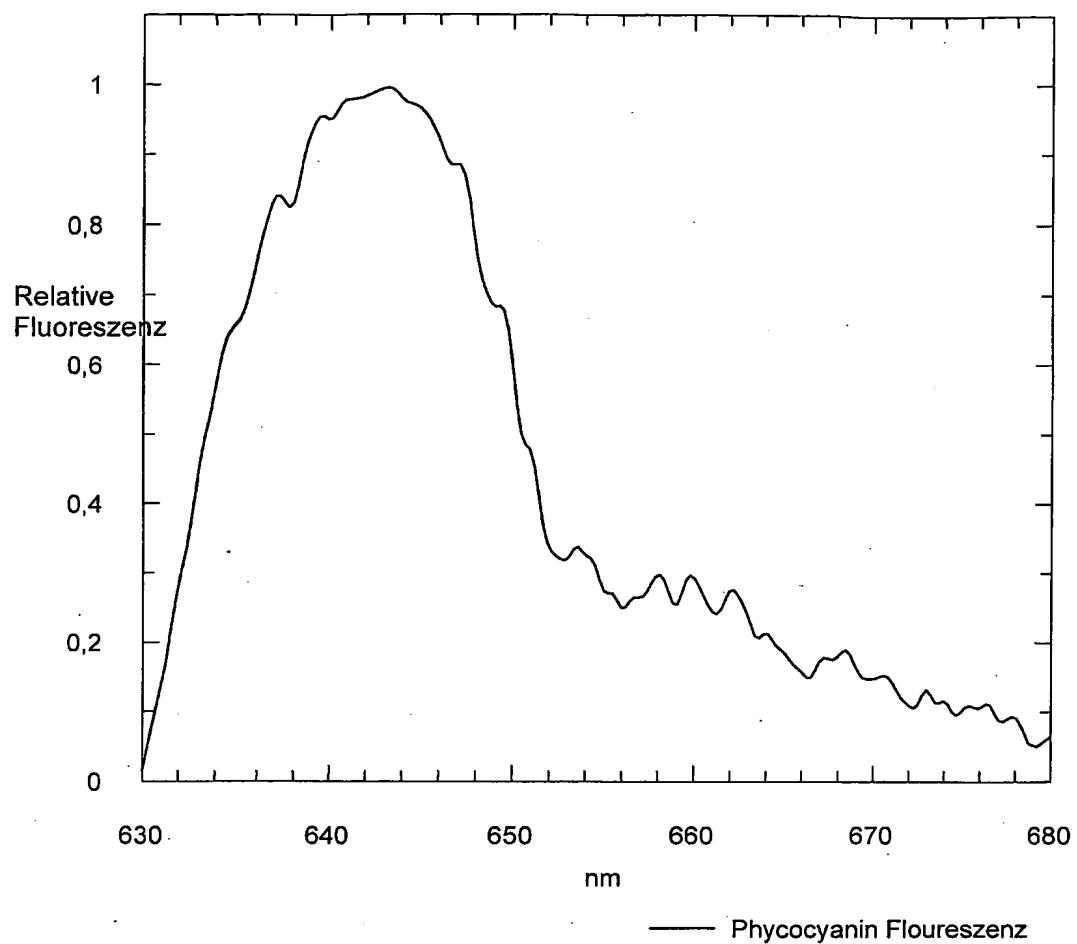


Fig. 8



**03-200**  
191 bp

SEQ. D. No 1

HindIII NcoI XbaI  
AAGC TTCCATGGAATCTCGAGACACCATCACCATCACCATTAGGTATAT  
TTCGAAGGTACCTTAGAGCTCTGTGGTAG TGGTAGGGTAATTCCATATA  
0b 20b 40b

Has-Tag Stop  
AACTCTGTAGAAATAAAGAGTATCATCTTCAAACCGCGGATTGTCGCGA  
TTGAGACATCTTATTCTCATAGTAGAAAGTTGGCGCCTAACAGCGCT  
60b 80b 100b

Clal NotI HpaI XbaI  
TCAAAATCGATATGTCTTATGCGGCCGCTTACGACCGTTAACTTGTCTAG  
AGTTTAGCTATACAGAATACGCCGGCGAATGCTGGCAATTGAACAAGATC  
100b 120b 140b

NheI BglII Sall EcoRI  
ATT GGGCTAGCGTTGAGATCTTAGAAA CGTCGACGAATT  
TAA CCCGATCGCAACTCTAGAAATCTTGCAGCTGCTTAAG  
160b 180b

03-201

SEQ. ID No 2

191 bp

HindIII BspHI XbaI  
 AAGCTT CATGAAATCTCGAGACACCATACCAT CACCATAAGGTATAT  
 TTCGAAGTACTTAGAGCTCTGTGGTAGTGGTAGTGGTAATTCCATATA  
 0b 20b 40b

*Hs Tag* *Stop*

SacII NruI  
 AACTCTGTAGAAATAAAGAGTATCATCTTCAAACCGCGGATTGTCGCGA  
 TTGAGACATCTTATTCTCATAGTAGAAAGTTGGCGCCTAACAGCGCT  
 60b 80b 100b

Clal NotI HpaI XbaI  
 TCAAATCGATATGTCTTATGCGCCGCTTACGACCGTTAACTTGTCTAG  
 AGTTTAGCTATACAGAATACGCCGGCGAATGCTGGCAATTGAACAAAGATC  
 100b 120b 140b

NheI BglII Sall EcoRI  
 ATTGGGCTAGCGTTGAGATCTTAGAAACGTCGACGAATTCTAACCGATCGCAACTCTAGAAATCTTGCAGCTGCTTAAAG  
 160b 180b

**03-215**  
173 bp

SEQ. ID No 3

HindIII NcoI XbaI  
 AAGCTTCCATGGAATCTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAATAAG  
 TTCGAAGGTACCTTAGAGCTCTATTCCATATGAGACATCTTATTTC  
 0b 20b 40b

SacII NruI ClaI  
 AGTATCATCTTCAAACCGGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGTCTTA  
 TCATAGTAGAAAGTTGGCGCCTAACAGCGTAGTTAGCTATACAGAAT  
 60b 80b 100b

NotI HpaI XbaI NheI BglII  
 TGC~~GGCCG~~CTTACGACCGTTAAC~~T~~TGTTCTAGATTGGGCTAGCGTTGAGA  
 ACG~~CCGG~~CGAATGCTGGCAATTGAACAAGATCTAACCCGATCGCAACTCT  
 100b 120b 140b

Sall EcoRI  
 TCTTAGAAACGTCGACGAATTCA  
 AGAAATCTTGCAGCTGCTTAAG  
 160b

**03-216**  
**173 bp**

*Seq. ID 4*

HindIII BspHI Xhol  
 AAGCTT CATGAAATCTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAATAAAG  
 TTCGAAAGTACTTTAGAGCTCTATTCCATATATTGAGACATCTTATTTC  
 0b 20b 40b

SacII NruI Clal  
 AGTATCATCTTCAAACCGCGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGTCTTA  
 TCATAGTAGAAAGTTGGCGCCTAACAGCGCTAGTTAGCTATACAGAAT  
 60b 80b 100b

NotI HpaI XbaI NheI BglII  
 TCGGGCCGCTTACGACCGTTAACTTGTCTAGATTGGCTAGCGTTGAGA  
 ACGCCGGCGAATGCTGGCAATTGAACAAGATCTAACCCGATCGCAACTCT  
 100b 120b 140b

Sall EcoRI  
 TCTTTAGAAACGTTCGACGAATTCAAG  
 AGAAATCTTGCAGCTGCTTAAG  
 160b

Seq. ID. 5

AOH - prim - for

GAGCTCATAT CCTTTGTTG TTCCGGGTG TACAATATGG ACTTCCTCTT 50  
 CTCGAGTATA GGAAAACAAC AAAGGCCAC ATGTTA TACC TGAAGGAGAA  
 TTCTGGCAAC CAAACCCATA CATCGGGATT CCTATAATAC CTTCGTTGGT 100  
 AAGACCGTTG GTTTGGGTAT GTAGCCCTAA GGATAT TATG GAAGCAACCA  
 CTCCCCTAACCA TGTTAGGTGGC GGAGGGGAGA TATACATAG AACAGATACC 150  
 GAGGGATTGT ACATCCACCG CCTCCCCCTCT ATATGTATTC TTGTCTATGG  
 AGACAAGACA TAATGGGCTA AACAAAGACTA CACCAATTAC ACTGCCTCAT 200  
 TCTGTTCTGT ATTACCCGAT TTGTTCTGAT GTGGTATATG TGACGGAGTA  
 TGATGGTGGT ACATAACGAA CTAATACTGT AGCCCTAGAC TTGATAGCCA 250  
 ACTACCAACCA TGTATTGCTT GATTATGACA TCGGGATCTG AACTATCGGT  
 TCATCATATC GAAAGTTTAC TACCCCTTTT CCATTCGCCA TCTATTGAAG 300  
 AGTAGTATAG CTTCAAAAGTG ATGGGAAAAA GGTAAACGGT AGATAACTTC  
 TAATAATAGG CGCATGCAAC TTCTTTCTT TTTTTTCTT TTCTCTCTCC 350  
 ATTATTATCC GCGTACGTTG AAGAAAAGAA AAAAAAAGAA AAGAGAGAGG  
 CCCGTTGTTG TCTCACCCATA TCCGCAATGA CAAAAZAAATG ATGGAAGACA 400  
 GGGCAACAAAC AGAGTGGTAT AGGCCTTACT GTTTTTTAC TACCTTCTGT  
 CTAAAGGAAA AAATTAACGA CAAAGACAGC ACCAACAGAT GTCGTTGTT 450  
 GATTTCTTT TTTAATTGCT GTTCTGTCG TGGTTCTCTA CAGCAACAAAG  
 CAGAGCTGAT GAGGGGTATC TCGAAGCACA CGAAAATTTT TCCTTCCTTC 500  
 GTCTCGACTA CTCCCCATAG AGCTTCGTGT GCTTGAAGA AGGAAGGAAG  
 ATTCAACGCAC ACTACTCTCT AATGAGCAAC GGTATACGGC CTTCCTCTCA 550  
 TAAGTGCCTG TGATGAGAGA TTACTCGTTG CCATA TGCGG GAAGGAAGGT  
 GTTACTTGAA TTGAAATAA AAAAAAGTTT GCTGT CTTGC TATCAAGTAT 600  
 CAATGAACCT AAACCTTATT TTTTTCAAA CGACA GAACG ATAGTTCTATA  
 AAATAGACCT GCAATTATTA ATCTTTGTT TCCTCGTCAT TGGTCTCGTT 650  
 TTTATCTGGA CGTTAATAAT TAGAAAACAA AGGAG CAGTA ACAAGAGCAA  
 CCCTTCTTC CTTGTTCTT TTTCTGCACA ATATTCAAG CTATACCAAG 700  
 GGGAAAGAAG GAACAAAGAA AAAGACGTGT TATAAGTTC GATATGGTTC  
 CATAACAATCA ACTATCTCAT ATACACCATG G 750  
 GTATGTTAGT TGATAGAGTA TATGTGGTAC C

AOH - prim - rev

SEQ. ID. 6

5p41

TCATGAAGAC CCCATTGACC GAAGCTGTTT CTACCGCAGA TT CTCAAGGT 50  
AGTACTTCTG GGGTAAGTGG CTTCGACAAA GATGGCGCTCT AA GAGTTCCA  
AGATTCTTGT CATCTACCGA ATTGCAAATT GCTTTCGGTA GATGAGACA 100  
TCTAAGAACCA GTAGATGGCT TAACGTTAA CGAAAGCCAT CTAACTCTGT  
AGCAAATGCT GGTTGCAAG CTGCTAAGGC TTTGACCGAT AA CGCTCAAT 150  
TCGTTTACGA CCAAACGTTG GACGATTCCG AACTGGCTA TT GCGAGTTA  
CTTTGGTTAA TGGTGGTGTGCT CAAGCTGTTT ACAACAAAGTT CCCATACACC 200  
GAAACCAATT ACCACGACGA GTTCGACAAA TGTTGTTCAA GGGTATGTGG  
ACTCAAACCC AAGGTAACAA CTTCGCTGCA GATCAAAGAG G TAAAGGATAAA 250  
TGAGTTGGG TTCCATTGTT GAAGCGACGT CTAGTTCTC C ZATTCTATT  
GTGTGCTAGA GATATTGGTT ACTACTTGAG AATTGTTACC T ACTGTTGG 300  
CACACGATCT CTATAACCAA TGATGAACTC TTAACAATGG A TGACAAACC  
TTGCAGGTGG TACTGGTCCA TTGGATGAAT ACTTGATTGC T GGTATTGAT 350  
AACGTCCACC ATGACCAGGT AACCTACTTA TGAACTAACG ACCATAACTA  
GAAATTAACA GAACCTCGA TTTGTCTCCA TCTTGGTACG T TGAAGCATT 400  
CTTTAATTGT CTTGGAAGCT AAACAGAGGT AGAACCATGC AACTTCGTAA  
GAAAGTACATT AAGGCAAATC ATGGTTTATC TGGTGATGCT A GAGATGAAG 450  
CTTCATGTAA TTCCGTTTAG TACCAAATAG ACCACTACGA T C TCTACTTC  
CAAACCTTA CTTGGATTAC GCTATTAACG CTTTGTCTAA C TCGAG 500  
GTTTGAGAAT GAACCTAATG CGATAATTGC GAAACAGATT GAGCTC

SEQ DM 7

13047  
 TCATGAGTGA ACCAAACTTG AACCCAGCTT ACACCTTGGG TCAAGCTA TT 50  
 AGTACTCACT TGGTTGAAC TTGGGTCGAA TGTGGAACCT AGTTCGAT AA  
 GCACAACTTGC AACAAACCGA AGATGCTTCT GCTAGATACT ATGCTGCT TG 100  
 CGTTTGAACG TTGTTGGCT TCTACGAAGA CGATCTATGA TACGACGA AC  
 GTGGATTGGT AGATTCAAGAG CTGCTCAACC AGAAACCATT GCTGCTT GT 150  
 CACCTAACCA TCTAAGTCTC GACGAGTTGG TCTTTGGTAA CGACGAA CA  
 TGGTTGCTTT GGAAGATGAA ACCGATAGAT CACCAAGATGG TGGTTACCCA 200  
 ACCAACGAAA CCTTCTACTT TGGCTATCTA GTGGTCTACC ACCAATGGGT  
 TTGAGAAGAA ACCTGCTAA GGCTTTGGGT AAATTGGGTG ATAGACAA GT 250  
 AACTCTTCTT TCGGACGATT CCGAAACCCA TTTAACCCAC TATCTGTCTA  
 TGTTCCAGCT TTGATTAAGG CTTTGGAAATG TGAAGATTAC TACGTTAGAG 300  
 ACAAGGTCGA AACTAATTCC GAAACCTTAC ACTTCTAATG ATGCAATCTC  
 AATCTGCTGC TCAAGCATTG GAAGGTTTG GTGATGCTAG AGCTATGGCT 350  
 TTAGACGACG AGTTCGTAAC CTTCCAAACC CACTACGATC TCGATAC CGA  
 CCATTGATGG CTAAGTTGAC CGGTGGTTTG GCTGCTGCTC AATTGGT TGA 400  
 GGTAACTACC GATTCAACTG GCCACCAAAC CGACGACGAG TTAACCA ACT  
 AGGTAAGCCA CATTGGCTC AACCATACGA AGCTATCATT GAAGCAT TGG 450  
 TCCATTGGGT GTAAACCGAG TTGGTATGCT TCGATAGTAA CTCGTA ACC  
 GTACTTTGCA AGCTGTTGAA TCTATTGGTT TGATTGAACC ATTCTTGGAA 500  
 CATGAAACGT TCGACAACCT AGATAACCAA ACTAACTTGG TAAGAAC CTT  
 CATTCTCAC CAAAGGTTCA ATACGCTGCT GCTAGAGCTT TGGTCAAATT 550  
 GTAAAGAGTG GTTCCAAAGT TATGCGACGA CGATCTCGAA ACAAGGTTAA  
 GACCGGGTGT AACAGATACG GTGATTTGTT GATTACCGCT TTGGGTGGTA 600  
 CTGGCCACTA TTGCTCTGC CACTAAACAA CTAATGGCGA AACCCACCAT  
 CAGATTGCA ATTGAGAAGA TCAGCTATGA TGGATTTGGG TGCTAC TGGT 650  
 GTCTAAACGT TAACTCTCT AGTCGATACT ACCTAAACCC ACGATGACCA  
 TACTTACCAAG GTGCTCAAGC TATTGCTAAG GCTTTCGCTG AAAACT CTTT 700  
 ATGAATGGTC CACGAGTTCG ATAACGATTC CGAAAGCGAC TTTGAGAAA  
 GAAGTTGATT GCTTGAGAG ATTGTGGGC TACCCATAGA CAAAGACAAG 750  
 CTTCAACTAA CGAAACCTC TAAACACCCG ATGGGTATCT GTTTCTGTTC  
 CATCTCTGA ATCTAAGGCT TTGTCTCCAG CTTCAAGACA AATTGGAA 800  
 GTAGAAGACT TAGATTCCGA AACAGAGGTC GAAGTCTGT TAAAAACCTT  
 TTGATGGATT CTTTGTTGAA CTCGAG 850  
 AACTACCTAA GAAACAACCTT GAGCTC  
 -Xhol-

Seq ① N. 8

*Rev 1*  
CCATGGAAGG TAACTCTGTT GTTACCCAG AAATTGAAAG ATTGATTCAA 50  
GGTACCTTCC ATTGAGACAA CAATGGGTC TTTAACCTTC TAACTAAGTT  
GCTGTTGAAA CGCGAGATTG TGCTGCTAAG TTAGTTGGTG CTGTTAGAGC 100  
CGACAACTTT GGCGTCTAAG ACGACGATTG AATCAACCAC GACAATCTCG  
TTTGGCTGCT ACCAGATCAC CATTGGCTGT TCCACAAATTG ACCACCGTTT 150  
AAACCGACGA TGGTCTAGTG GTAACCGACA AGGTGTTAAC TGGTGGCAAA  
TGAGATACAA CAACCCAGGT GCTGCTGTTG CTGCAGTTGA TGTTTGATT 200  
ACTCTATGTT GTTGGTCCA CGACGACAAC GACGTCAACT ACCAAACTAA  
CAAATTGGTG ATGCTGCTAT GACCCATTG TTGGCAAACA TGGATGGTTA 250  
GTTTAACCAC TACGACGATA CTGGGTAAC AACCGTTGT ACCTACCAAT  
CAACTACGGT GCTAGAGCTT GGCGCTACTAG AGCTTGTGCT GGTATTGGTG 300  
GTTGATGCCA CGATCTCGAA CCCGATGATC TCGAACACGA CCATAACCAC  
ATCCAAGAGC TTTGGCTTG TTGCAAGAAG CTGCTTGAC CGATTTCGCT 350  
TAGGTTCTCG AAACCGAAAC AACGTTCTTC GACGAAACTG GCTAAAGCGA  
TTGCTCTGTTA GAAGAGCTGC TGCTAAGGGT TTGGGTTCT TGAGATGGCA 400  
AACAGACAAT CTTCTCGACG ACGATTCCCA AACCCAAAGA ACTCTACCGT  
ATCTTTGCCA CAAGAAGAAC AAGAAACCGT TCAAAAGGCT ATTTACGATA 450  
TAGAAACGGT GTTCTCTTG TTCTTTGGCA AGTTTCCGA TAAATGCTAT  
CCTTGATTCA AGTTTGTGAA GATCCAGAAT GGGTTGTTAG ATACGGTGCT 500  
GGAACTAAGT TCAAACACTT CTAGGTCTTA CCCAACATC TATGCCACGA  
ATTGCTGGTT TGGAAAACATT GGCTAAGCAA GCTCAACATT ACAGACAACC 550  
TAACGACCAA ACCTTTGAA CCGATTCTGTT CGAGTTGTAA TGTCTGTTGG  
ATTGAAGGAT TTCTTGCAT CTTCGTTGA ACAAGAACCA GAAGCTATTG 600  
TAACTTCCCTA AAGAACGTTA GAAAGCAACT TGTTCTGGT CTTCGATAAC  
TTGGTGAAAG AATTTTGTGG ACCTTGGAAA ACATTGGTCC AATTAACCTCG 650  
AACCACTTTC TAAACACCC TGGAACCTTT TGTAACCAGG TTAATTGAGC  
AG  
TC

700

SEQ. ID. No 9

*Bp417*

TCATGAGTGT AAACTTGGCT TCACAATTGA GAGAAGGTAC TAAGAAGTCT 50  
 AGTACTCACA TTTGAACCGA AGTGTAACT CTCTTCATG ATTCTTCAGA  
 CATTCTATGG CTGAAAACGT TGTTTCGTT AAGTGTTCCT TGAGGGTGT 100  
 GTAAGATACC GACTTTGCA ACCAAAGCAA TTCACAAAGA ACTTCCCACA  
 TGTTGAAAAG AACTCTTACA GAAAGTTAGT TGTTAACTTG TACTTCGTTT 150  
 ACAACCTTTC TTGAGAATGT CTTCAATCA ACCATTGAAC ATGAAGCAAA  
 ACTCTGCTAT GGAAGAAGAA ATGGCTAAGT TCAAGGATCA TCCAATTTCG 200  
 TGAGACGATA CCTTCTTCTT TACCGATTCA AGTTCTTAGT AGGTTAAAAC  
 TCTCATATCT ACTTCCCAGA ATTGAACAGA AAGCAATCTT TGGAACAAGA 250  
 AGAGTATAGA TGAAGGGTCT TAACCTGTCT TTGTTAGAA ACCTTGTCT  
 TTTGCAATTTC TACTACGGTT CAAACTGGAG ACAAGAAGTT AAGATTTCTG 300  
 AACACGTTAAC ATGATGCCAA GTTGACCTC TGTTCTCAA TTCTAAAGAC  
 CTGCTGGTCA AGCATACTGTT GATAGAGTTA GACAAGTTGC TGCTACCGCT 350  
 GACGACCAGT TCGTATGCAA CTATCTCAAT CTGTTCAACG ACGATGGCGA  
 CCAGAATTGT TGGTGCTCA TTCTTACACC AGATACTTGG GTGATTGTC 400  
 GGTCTTAACA ACCAACGAGT AAGAATGTGG TCTATGAACC CACTAAACAG  
 TGGTGGTCAA ATTTGAAGA AGATTGCTCA AAACGCTATG AACTTGCATG 450  
 ACCACCAGTT TAAAACCTCT TCTAACGAGT TTTGCGATAC TTGAACGTAC  
 ATGGTGGTAC TGCTTCTAC GAATTGCAG ATATTGATGA TGAAAAGGCT 500  
 TACCACCATG ACGAAAGATG CTAAACGTC TATAACTACT ACTTTCCGA  
 TTCAAGAACCA CCTACAGACA AGCTATGAAC GATTTGCCAA TTGATCAAGC 550  
 AAGTTCTTGT GGATGCTGT TCGATACTTG CTAAACGGTT AACTAGTTCG  
 TACCGCTGAA AGAATTGTTG ATGAAGCAAA CGATGCTTTC GCTATGAACA 600  
 ATGGCGACTT TCTTAACAAAC TACTTCGTTT GCTACGAAAG CGATACTTGT  
 TGAAGATGTT CAACGAATTG GAAGGTAACT TGATTAAGGC TATTGGTATT 650  
 ACTTCTACAA GTTGCTTAAC CTTCCATTGA ACTAATTCCG ATAACCATAA  
 ATGGTTTTCA ACTCTTGAC CAGAAGAAGA TCACAAGGTT CTACCGAAGT 700  
 TACCAAAAGT TGAGAAACTG GTCTTCTTCT AGTGTCCAA GATGGCTTC  
 TGGTTGGCT ACCTCTGAAG GTAACCTCGAG 750  
 ACCAACCGA TGGAGACTTC CATTGAGCTC  
*└ 401 ─┘*

SEQ. ID No 10

~Mat~  
CCATGGCTGT TACCGATTG TCTTGACCA ACTCTTCTTT GATGCCAACC 50  
GGTACCGACA ATGGCTAAC AGAAACTGGT TGAGAAGAAA CTACGGTTGG  
TTGAACCCAA TGATTCAACA ATTGGCTTTG GCTATTGCTG CTTCTGGCA 100  
AACTTGGGTT ACTAAGTTGT TAACCGAAC CGATAACGAC GAAGAACCGT  
ATCTTGCCTA TTGAAGCCAT ACCAATTGCC AGAAGATTG GGTTACGTTG 150  
TAGAAACGGT AACTTCGGTA TGGTTAACGG TCTTCTAAAC CCAATGCAAC  
AAGGCAGATT GGAAGGTGAA AAGTTGGTTA TTGAAAACAG ATGTTACCAA 200  
TTCCTGCTAA CCTTCACCT TTCAACCAAT AACTTTGTC TACAATGGTT  
ACCCCCACAAAT TCAGAAAGAT GCATTTGGAA TTGGCTAAAG TTGTTAAGGG 250  
TGGGGTGTAA AGTCTTCTA CGTAAACCTT AACCGATTTC AACCATTC  
TTTGGATATT TTGCATTGTT TTATGTTCCC AGAACCATTTG TACGGTTTGC 300  
AAACCTATAAA AACGTAACAC AATACAAGGG TCTTGGTAAAC ATGCCAACG  
CATTGTTCCG TTGTGATATT GTGCTGGTC CAGGTGGTGT TTCTGCTGCT 350  
GTAACAAGCC AACACTATAAA CAACGACCA GTCCACCCACA AAGACGACGA  
ATTGCAGATT TGTCTCCAAAC CCAATCAGAT AGACAATTGC CAGCTGCTTA 400  
TAACGTCTAA ACAGAGGTTG GGTAGTCTA TCTGTTAACG GTGACGAAAT  
CAAAAAGTCT TTGGCTGAAT TGGGTCAACC AGAATTGAA CAACAAAGAG 450  
GGTTTTCAGA AACCGACTTA ACCCAGTTGG TCTTAAACTT GTGTTTCTC  
AATTGCCACC TTGGGGTGAAT ATTCTCTCTG AATACTGTTT GTTCATTAGA 500  
TTAACGGTGG AACCCCCACTT TAAAAGAGAC TTATGACAAA CAAGTAATCT  
CCATCAAACG TTACCGAAGA AGAAAGATTG GTTCAAAGAG TTGTTGATTT 550  
GGTAGTTGTC AATGGCTTCT TCTTCTAAG CAAGTTCTC AACAACTAAA  
CTTGCAAATT CATTGTCATC AATCTATTGT TGCTGAACCA TTGCTGAAG 600  
GAACGTTAA GTAACAGTAG TTAGATAACA ACGACTTGGT AACAGACTTC  
CTCAAACCTT GGAACATAGA CAAGGTCAAA TTCATTACTG TCAACAAACAA 650  
GAGTTGAAA CCTTGATCT GTCCAGTTT AAGTAATGAC AGTTGTTGTT  
CAAAAGAACG ATAAGACCAAG AAGAGTTTG GAAAAGGCTT TCGGTGAAGC 700  
GTTTTCTGTC TATTCTGGTC TTCTCAAAAC CTTTCCGAA AGCCACTTCG  
ATGGGCTGAA AGATACATGT CTCAGTTT GTTCGATGTT ATTCAAAACT 750  
TACCCGACTT TCTATGTACA GAGTTCAAAA CAAGCTACAA TAAGTTTGA  
X<sup>41</sup>  
CGAG  
GCTC 800

SEQ. ID. NO. 11

ATGTTCGACGTATTCACTCGGGTTGTTCCCAAGCTGATGCTCGCGCGAGTACCT  
CTCTGGTTCTCAGTTAGATGCTTGAGCGCTACCGTTGCTGAAGGCAACAAACGG  
ATTGATTCTGTTAACCGCATCACCGTAATGCTCCGCTATCGTTCCAACGCTGC  
TCGTGCTTGTTCGTTGAACAGCCCCAATTAATCCAACCCGGTGGAAACGCCCTAC  
ACCAGCCGTCGTATGGCTGCTTGCCTGACATGGAAATCATCCTCCGCTATGT  
TACCTACGCAACCTTCACCCGGCGACGCTTCCGTTAGAAGATCGTTGCTTGAAC  
GGTCTCCGTGAAACCTACGTTGCCCTGGGTGTTCCCGTGCTCCGTAGCTGCTGG  
CGTTCAAAAAATGAAAGAAGCTGCCCTGGACATCGTTAACGATCCCAATGGCATC  
ACCCGTGGTGAATTGCAGTGCTATCGTTGCTGAAATCGCTGGTTACTTCGACCGCG  
CCGCTGCTGCCGTAGCCTAG

SEQ. ID No 12

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVRITGNASAIVSNAAR  
ALFVEQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLR  
ETYVALGVPGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAA  
VA

TCGCGCGTTCGGTATGACGGTAAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCGGAGAC  
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAAGGGCGC  
GTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAG  
ATTGTACTGAGAGTGCACCACGCTTCAATTCAATTCAATTCTATTCTTTTATTCT  
TTTTTTGATTGGTTCTTGAAATTGGTATTGGTATATACGCATATGTAGT  
GAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTAGATTGGTATATACGCATATGTAGT  
GTTGAAGAAACATGAAATTGCCAGTATTCTTAACCCAACGTGACAGAACAAAA  
ACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTCGAAAGTACATATAAGGAACGTGCT  
GCTACTCATCCTAGCCTGTGCTGCCAGCTATTAAATATCATGCAAGAAAAGC  
AAACAAACTGTGTGCTTCATTGGATGTTGTACCAAGGAATTACTGGAGTT  
AGTTGAAGCATTAGGTCCAAAATTGTTACTAAAAACACATGTGGATATCTG  
ACTGATTTCATGGAGGGCACAGTTAACGCTAAAGGCAATTCCGCCAAGT  
ACAATTTCATCTCGAAGACAGAAAATTGCTGACATTGTAATACAGTCAA  
ATTGCAGTACTCTGGGGTGTATAACAGAATAGCAGAACATTACGAAT  
GCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGGTTGAAGCAGGGCAGAA  
GAAGTAACAAAGAACCTAGAGGCCTTGTATGTTAGCAGAACATTGTCATGCAAG  
GGCTCCCTATCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCAAGAGCG  
ACAAAGATTGTTATCGGCTTATTGCTAAAGAGACATGGGTGGAAGGAGATGA  
AGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTAGATGACAAGGGAGAC  
GCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTACAGGATCTGACA  
TTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTGCAAAGGAAGGGATGCTAAGGTAGAGG  
GTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTGAGAAGATGCGGCCAGC  
AAAACAAAAACTGTATTATAAGTAAATGATGTATACTAAACTCACAAATTAG  
AGCTTCAATTAAATTATCAGTTATTACCTGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT  
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAATTGTAACGTTAATATTGTTAAA  
TTCGCGTTAAATTGTTAAATCAGCTCATTTTAACCAATAGGCCAAATCGG  
CAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCA  
GTTTGGACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGA  
AAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTT  
TTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCC  
GATTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCAACGTGGCAGAAAGGAAGGGAAG  
AAAGCGAAAGGAGCGGGCGTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGC  
GTAACCACCAACCCGCCGCTTAATGCCCGCTACAGGGCGTCGCGCATT  
CGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCCCTCTCGCT  
ATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGGATGTGCTGCAAGCGATTAAGTGGTAAC  
GCCAGGGTTTCCCAGTCAGCAGCTGTAACAGCGGCAAGTGAATTGTAATAC  
GAACCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCATATCCTTTGTTGTTCCGGGTGACAA  
TATGGACTTCCCTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCCCTATAATACC  
TTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGAGGGAGATAACAATAGAACAGA  
TACCAAGACAAGACATAATGGCTAAACAAAGACTACACCAATTACACTGCCCTCATT  
GATGGTGGTACATAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTGATAGCCATCATCA  
TATCGAAGTTCACTACCCCTTTCCATTGCCATCTATTGAAGTAAATAAGGG  
CATGCAACTCTTTCTTTCTCTCTCCCCGTTGTCTCACCATA  
TCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAATTACGACAAA  
GACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTGAAGCAC  
ACGAAACTTTCTCCCTCATTGCAACTACACTCTAATGAGCAACGGTAT  
ACGGCCTCCTCCAGTACTTGAATTGAAATAAAAAAGTTGCTGTCTGCT  
ATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAACTTTGTTCCCTCGTCAATTGTC  
GTTCCCTTCTCCCTGTTCTTCTGCACAATATTCAAGCTATACCAAGCATA

CAATCAACTATCTCATATACACCATGGAAGGTAACCTGTTGTTACCCCAGAAAT  
TGAAAGATTGATTCAAGCTGTTGAAACCGCAGATTCTGCTGCTAAGTTAGTTGGT  
GCTGTTAGAGCTTGGCTGCTACCAGATACCATTGGCTGTTCCACAATTGACCAC  
CGTTTGAGATACAAACAACCCAGGTGCTGCTGTTGCTGAGTTGATGGTTGATT  
AAATTGGTGTAGCTGCTATGACCCATTGTTGGCAAACATGGATGGTACAAC  
CGGTGCTAAGAGCTGGGCTACTAGAGCTGCTGGTATTGGTGTAGCAAGAGCT  
TTGGCTTGTGCAAGAAGCTGCTTGAACCGATTGCTTGTGCTGAGAGCT  
TGCTGCTAAGGGTTGGGTTCTTGAGATGGCAATCTTGCACAAAGAAGAACAA  
GAAACCGTTCAAAAGGCTATTACGATACCTGATTCAAGTTGTGAAGATCCAG  
AATGGGTTGTAGATAACGGTGCTATTGCTGGTTGGAAAACCTGGCTAAGCAAGC  
TCAACATTACAGACAACCAATTGAAGGATTCTGCAATCTTGTGAACAAGAA  
CCAGAAGCTATTGTTGGTGAAGAATTGTTGGACCTTGGAAAACATTGGTCAA  
TTAACTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAATAAAGAGTATCATCTTCAA  
CCGCGGATATCCATTGTGTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCCTTTCTGG  
CAACCAAACCCATACATCGGGATTCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATG  
TAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAAGACAAGACATAATGG  
GCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCTTGTGATGGTGTACATAACGAAC  
TAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATCGAAGTTCACTACCCIT  
TTTCCATTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGATGCAACTCTTTCTTTT  
TTTCTTCTCTCTCTCCCGTTGTTGCTCACCATAATCGCAATGACAAAAAAATG  
ATGGAAGACACTAAAGGAAAAAAATTACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCG  
TTGTTCCAAGAGCTGATGAGGGGTATCTGCAAGCACACGAAACTTTTCTTCCITC  
ATTCAACGCACACTACTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCAGTTACT  
TGAATTGAAATAAAAAAAAGTTGCTGCTTGTCTATCAAGTATAAATAGACCTG  
CAATTATTAAATCTTTGTTCCCTCGTCAATTGTTCTGTTCCCTTCTTCCITGTTCT  
TTTCTGACAATATTCAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACA  
CCATGGCTGTTACCGATTGCTTGCACCAACTCTCATTGATGCCAACCTTGAAC  
CCAATGATTCAACAATTGGCTTGGCTATTGCTGCTTGGCAATCTTGCCTT  
GAAGCCATACCAATTGCCAGAAGATTGGGTACGTTGAAGGCAGATTGGAAGG  
TGAAAAGTTGGTTATTGAAAACAGATGTTACCAAAACCCACAATTAGAAGATG  
CATTGGAAATTGGCTAAAGTTGGTAAGGGTTGGATATTGCAATTGTTATGTT  
CCCAGAACATTGTACGGTTGCCATTGTCGGTTGTGATATTGTTGCTGGTCCAG  
GTGGTGTCTGCTGCTATTGCAAGATTGGCTTGGCTTGGCAATTGGTCAACCAGAATTG  
CCAGCTGCTTACCAAAAGTCTTGGCTGAATTGGTCAACCAGAATTGAAACAAC  
AAAGAGAATTGCCACCTGGGTGAAATTCTCTGAATACTGTTGTTATTGTC  
CCATCAAACGTTACCGAAGAAGAAAGATTGTTCAAAAGAGTTGTTGATTGTC  
AAATTCAATTGTCATCAATCTATTGTTGCTGAACCAATTGCTGAAGCTCAAACCTT  
GAACATAGACAAGGTCAAATTCAATTACTGTCACAAACAACAAAGAACGATAAG  
ACCAGAAAGATTGGAAAGGCTTGGCTGAAGCATGGGCTGAAAGATAACATG  
TCTCAAGTTGTTGCTGATGTTATTCAAAACTCGAGATAAGGTATATAACTCTG  
AAATAAAAGATCATCTTCAAAACCGCGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGTC  
TTATGCGGCCGATATCCTTGTGTTCCGGGTGACAAATATGGACTTCCCTTT  
TCTGGCAACCAAAACCCATACATCGGGATTCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTA  
ACATGTAAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAAGACAAGACAT  
AATGGGCTAAACAAAGACTACACCAATTACACTGCTTCAATTGATGGTGGTACATAA  
CGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTGATAGCCATCATCATCGAAGTTCACT  
ACCCCTTTCCATTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTCTTT  
CTTTTCTCTCTCTCCCGTTGTTGCTCACCATAATCGCAATGACAAA  
AAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAAATTACGACAAAGACAGCACCAACA  
GATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTGCAAGCACACGAAACTTTTC  
CTTCCCTCATCACGACACTACTCTCAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCITC

CAGTTACTGAATTGAAATAAAAAAGTTGCTGTCTGCTATCAAGTATAAA  
TAGACCTGCAATTATTAATCTTTGTTCTCGTATTGTTCTCGTCCCTTCTTC  
CTTGTTCCTTCTGACAATATTCAAGCTATACCAAGCATAACATCAACTATC  
TCATATACACCATGAGTGAACCAAACCTGAACCCAGCTACACCTGGATCAAGC  
TATTGCAAACATTGCAACAAACCGAAGATGCTCTGCTAGATACTATGCTGCTGG  
TGGATTGGTAGATTGAGCTGCTCAACCAGAAACCATTGCTGCTTGTGTTG  
CTTGGAAAGATGAAACCGATAGATCACCAGATGGTGGTACCCATTGAGAAGAA  
ACGCTGCTAAGGCTTGGTAAATTGGGTGATAGACAAGTGTCCAGCTTGAT  
TAAGGCCTTGGAAATGTGAAGATTACTACGTTAGAGAAATGCTGCTCAAGCATTG  
GAAGGTTGGGTGATGCTAGAGCTATGGCTCCATTGATGGCTAAGTTGACCGGTG  
GTTGGCTGCTCAATTGGTGAAGGTAAAGCCACATTGGCTCAACCATAACGA  
AGCTATCATTGAAAGCATGGTACTTGTCAAGCTGTGAATCTATTGGTTGATTG  
AACCATCTGGAACATTCTCACCAAAGGTTCAATACGCTGCTGCTAGAGCTTG  
TTCCAATTGACCGGTGATAACAGATAACGGTATTGTTGATTACCGCTTGGGTG  
GTACAGATTGCAATTGAGAAGATCAGCTATGATGGATTGGTGTACTGGTA  
CTTACCAAGGTGCTCAAGCTATTGCTAAGGCTTCTGCTGAAAACCTTGAAGTTGA  
TTGCTTGAGAGATTGTTGGCTACCCATAGACAAAGACAAGCATCTTCTGAATC  
TAAGGCCTTGTCTCCAGCTCAAGACAAATTGGAATTGATGGATTCTTGTGA  
ACTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAATAAGAGTATCATCTTCAAACCG  
CGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGTCTTATGCGGCCGCTACGACCGTTAACCT  
GTTCTAGAATATCCTTTGTTGTTCCGGGTGTCACAATATGGACTTCCCTTCTG  
GCAACCAAACCCATACATGGGATTCTATAATACCTCGTGGTCTCCCTAACAT  
GTAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATAACAGACAAGACATAATG  
GGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATGATGGTGTACATAACGAA  
CTAATACTGTAGCCCTAGACTTGTATGCCATCATATCGAAGTTCACTACCC  
TTTCCATTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGATGCAACTCTTTCTT  
TTTCTTTCTCTCTCCCCGTTGTTGTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAAT  
GATGGAAGACACTAAAGGAAAAAAATTACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTC  
GTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGTATCTGAAGGACACGAAACTTTCTCCT  
CATTCACGCACACTACTCTAATGAGCAACGGTATACGCCCTCCCTAGTTAC  
TTGAATTGAAATAAAAAAAAGTTGCTGTCTGCTATCAAGTATAAAATAGACCT  
GCAATTATTAATCTTGTCTCGTATTGTTCTGCTTCTCCTTCTCCTGTT  
TTTCTGCAAAATATTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCAACTATCTCATATAC  
ACCATGAGTGTAAACTGGCTTCAACAATTGAGAGAAGGTACTAAGAAGTCTCATT  
CTATGGCTGAAACGTTGGTTCTGTTAAGTGTCTGCTTGAAGGGTGTGTTGAAAA  
GAACCTTACAGAAAGTTAGTGGTAATTGTACTCTGTTACTCTGCTATGGAAG  
AAGAAATGGCTAAGTCAAGGATCATCCAATTGCTCTCATATCTACTTCCAGA  
ATTGAACAGAAAGCAATCTTGGAAACAAGATTGCAATTCTACTACGGTTCAAAC  
TGGAGACAAGAAGTTAAGATTCTGCTGCTGGTCAAGCATACTGTTGATAGAGTTA  
GACAAGTTGCTGCTACCGCTCCAGAATTGTTGGTGTCTATTCTACACCAGATAC  
TTGGGTGATTGCTGGTGGTCAAATTGAAAGAAGATTGCTAAAACGCTATGA  
ACTTGCTGATGGTGGTACTGCTTCTACGAATTGCAAGTATTGATGATGAAAAA  
GGCTTCAAGAACACCTACAGACAAGCTATGAACGATTGCAATTGATCAAGCT  
ACCGCTGAAAGAATTGTTGATGAAGCAAACGATGCTTCTGCTATGAACATGAAGA  
TGTCAACGAATTGGAAGGTAACCTGATTAAGGCTATTGGTATTATGGTTTCAAC  
TCTTGACCAGAAGAAGATCACAAGGTTCTACCGAAGTTGGTTGGCTACCTCTG  
AAGGTAACTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAATAAGAGTATCATCTTC  
AAACCGGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGCTTATGCGGCCGCTACGACCG  
TTAACTTGTCTAGATTGGCTAGCGTTGAGATCTATATCCTTGTGTTCCGG  
GTGTACAATATGGACTTCCCTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCC  
ATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGAGATATAACAT

AGAACAGATACCAAGACAAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACAC  
TGCCTCATTGATGGTGGTACATAACGAACATAACTGTAGCCCTAGACTGATAG  
CCATCATCATATCGAAGTTCACTACCCCTTTCCATTGCCATCTATTGAAGTAA  
TAATAGGCGCATGCAACTCTTTCTTTCTTCTCTCTCCCCCGTTGT  
CTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAATT  
AACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTCCAGAGCTGATGAGGGTAT  
CTCGAACACGAAACCTTCTCCTTCAGTTACTGAATTGAAATAAAAAAGTT  
GCTGTCTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAAATCTTTGTTCTCG  
TCATTGTTCTCGTCCCTTCTCCTGTTCTTCTGCACAATATTCAAGCTAT  
ACCAAGCATAACAATCAACTATCTCATATAACACCATGAAGACCCCATTGACCGAAG  
CTGTTCTACCGCAGATTCTCAAGGTAGATTCTGTATCTACCGAATTGCAAATT  
GCTTCGGTAGATTGAGACAAGCAAATGCTGGTTGCAAGCTGCTAAGGCTTGA  
CCGATAACGCTCAATCTTGGTTAATGGTGCTGCTCAAGCTGTTACAACAAGTT  
CCATACACCACTCAAACCCAAGGTAACAACCTCGCTGCAGATCAAAGAGGTAAG  
GATAAGTGTGCTAGAGATATTGGTTACTACTTGAGAATTGTTACCTACTGTTGGT  
TGCAGGTGGTACTGGTCATTGGATGAATACTTGATTGCTGGTATTGATGAAATT  
AACAGAACCTCGATTGTCCTCATCTTGGTACGGTAAGCATTGAAGTACATTA  
AGGCAAATCATGGTTATCTGGTATGCTAGAGATGAAGCAAACCTTACTTGG  
TTACGCTATTAAACGCTTGTCTAACTCGAGATAAGGTATATAACTCTGTAGAAAT  
AAAGAGTATCATCTTCAAACCGCGGATTGTCGCGATCAAATCGATATGTCTTAT  
GGGGCCGTTACGACCGTTAACTTGTCTAGATTGGTAGCGITGAGATCTTAG  
AAACGTCGACCTCGAGGGGGGGCCGGTACCCAGCTTGTCCCTTAGTGG  
GTTAATCCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGTGAAATTGTT  
ATCCGCTACAATTCCACACAAACATAGGAGCCGGAAAGCATAAAGTGTAAAGCCT  
GGGGTGCCTAATGAGTGGTAACTCACATTAAATTGCGTTGCGCTACTGCCGC  
TTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCG  
GGGAGAGGCCGGTTGCGTATTGGCGCTTCCGCTCGCTCACTGACTCGCT  
GCGCTCGGTGTCGGCTGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCCGGTAATA  
CGGTTATCCACAGAACGAGGAAACGTAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGC  
CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGGTGTGGCTGGCTTTCCATAGG  
CTCGGCCCCCTGACGAGCATCACAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA  
AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGGTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC  
GCTCCCTGTCGACCCGCTTACCGGATAACCTGTCCGCTTCTCCCTTCG  
GGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTGGTGTAGG  
TCGTTGCTCCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCCGGTCAAGCCCACCGCTG  
CGCCTTATCCGGTAACATCGTCTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCG  
CCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCCGGT  
GCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT  
TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTC  
TTGATCCGGAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAG  
CAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTCTACGG  
GGTCTGACGCTCACTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTGGTGTAGGAGATT  
ATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTAAATTAAAATGAAGTTAAATCA  
ATCTAAAGTATATGAGTAAACCTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG  
AGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTATTGCTCATCCATAGTTGCTGACTGCC  
GTCGTGTAGATAACTACGGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAA  
TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCAAGCC  
AGCCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAG  
TCTATTAAATTGTTGCCGGAAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCCAGTTAATAGTTGC  
GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTGTGGTATG

GCTTCATTCAAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTT  
GTGAAAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGGTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTG  
GCCGCACTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCAT  
GCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA  
GAATAGTGTATGCGGCACCGAGTGCTCTGCCCGCGTCAATAACGGATAATA  
CCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTCGGG  
GCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTTGTGAGATCCAGTCATGTAACCCACT  
CGTGCACCCAACGTGATCTCAGCATCTTACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGC  
AAAAACAGGAAGGAAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAAT  
GTTGAATACTCATACTCTCCCTTTCAATATTATGAAAGCATTTATCAGGGTTATT  
GTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGT  
TCCGCGCACATTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATC  
ATGACATTAACCTATAAAAATAGCGTATCACGAGGCCCTTCGTC